Aus dem Lehrstuhl für Biochemie der Pflanze
der Universität Göttingen

ÜBER DIE INTERAKTION VON REDUZIERTEM UND OXIDIERTEM N-METHYL PHENAZONIUM METHOSULFAT MIT CHLOROPLASTEN AUS PISUM SATIVUM

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Bernhard Schmidt
aus Vohenstrauß

Göttingen 1976

Aus dem Lehrstuhl für Biochemie der Pflanze
der Universität Göttingen

ÜBER DIE INTERAKTION VON REDUZIERTEM UND OXIDIERTEM N-METHYL PHENAZONIUM METHOSULFAT MIT CHLOROPLASTEN AUS PISUM SATIVUM

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Bernhard Schmidt
aus Vohenstrauß

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D7

Referent: Professor Dr. A. Trebst

Korreferent: Professor Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1976

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
	Verzeichnis der Abkürzungen	1
1.	Einleitung	2
2.	Material und Methoden	9
2.1.	Anzucht der Pflanzen	9
2.2.	Isolation der Chloroplasten	9
2.3.	Präparation von Tris-gewaschenen Chloroplasten	9
2.4.	Präparation von trypsin-behandelten Chloroplasten	10
2.5.	Der Reaktionsansatz	10
2.6.1.	Fluoreszenzmessungen bei kontinuierlicher Belichtung	11
2.6.2.	Fluoreszenzmessungen innerhalb kurzer Lichtperioden	13
2.6.3.	Messung von Fluoreszenz-Induduktions-kurven und der Kinetik ihrer Dunkel-restoration	14
2.7.	Messung von lichtinduzierten Trans-missionsänderungen	14
2.8.	Messung des Elektronentransportes durch P_{700}	17
2.9.	Messung der lichtinduzierten Bindung von PMS an die Membranen	17
2.10.	Messung der Photophosphorylierung	17
2.11.	Chemikalien	18
3.	Ergebnisse	19
3.1.	Die Deutung von Fluoreszenz-Induktions-kurven	19
3.2.	Der Einfluß von Mg^{2+}-Ionen und von PMS auf die Fluoreszenz	23

Seite

3.3. Der Einfluß von reduziertem PMS auf die Chlorophyllfluoreszenz 27

3.3.1. Die Reduktion von PMS 27

3.3.2. Die Fluoreszenzabnahme im Verlauf der PMS-Reduktion 29

3.3.3. Die Fluoreszenzabnahme als Funktion der Konzentration an reduziertem PMS ,..... 32

3.3.4. Der Einfluß von Mg^{2+} auf den durch reduziertes PMS bewirkten Fluoreszenz-Quench 35

3.3.5. Der Einfluß von reduziertem PMS auf die variable Fluoreszenz 37

3.4. Lichtabhängiger Quench der Fluoreszenz bei Gegenwart von PMS und DCMU 39

3.4.1. Bestehende Beobachtungen und Interpretationen 39

3.4.2. Die experimentellen Bedingungen, unter denen der lichtinduzierte Fluoreszenz-Quench abläuft 41

3.4.3. Der Einfluß von Entkopplern auf den Fluoreszenz-Quench 45

3.5. Lichtinduzierte transiente Absorptionsabnahme im PMS-System im Bereich der PMS-Absorption 48

3.5.1. Die spektralen Eigenschaften des Transienten und der Einfluß von $MgCl_2$ 48

3.5.2. Bindung von PMS an die Thylakoidmembranen 53

3.6. Qualitativer Vergleich des lichtinduzierten Fluoreszenz-Quenches und des PMS-Transienten 56

3.6.1. Der Einfluß von Entkopplern 58

3.6.2. Der Einfluß des pH-Wertes 61

3.6.3. Der Einfluß von Triton X-100 61

Seite

3.6.4. Der Einfluß einer Trypsinbehandlung 61

3.7. Quantitativer Vergleich des lichtinduzierten Fluoreszenz-Quenches und des PMS-Transienten 66

3.8. Fluoreszenz-Quench mit anderen Kofaktoren des zyklischen Elektronentransportes 72

3.8.1. Fluoreszenz-Quench mit DAD als Kofaktor 72

3.8.2. Fluoreszenz-Quench mit TMPD als Kofaktor ... 74

3.8.3. Fluoreszenz-Quench mit Pyocyanin als Kofaktor 74

3.9. Der Einfluß von oxidiertem und reduziertem PMS auf die Rückreaktion von Photosystem II 77

3.9.1. Die Restoration der Fluoreszenzinduktion und die Rückreaktion von PS II 77

3.9.2. Der Bezug der Fluoreszenzinduktionskurven zur Rückreaktion von PS II 79

3.9.3. Der Einfluß von oxidiertem PMS auf die Rückreaktion 80

3.9.4. Die Kinetik der Rückreaktion 83

3.9.5. Wirkungsweise von CCCP und PMS bezüglich der Rückreaktion von Photosystem II 86

3.9.6. Hemmung der Rückreaktion von Photosystem II durch reduziertes PMS 90

3.9.7. Der Einfluß von reduziertem PMS auf die Fluoreszenzinduktion in Tris-gewaschenen Chloroplasten 94

3.10. Ergänzende Bemerkung 96

4. Diskussion 97

5. Zusammenfassung 108

6. Literaturverzeichnis 110

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0039

Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydazon
Chl	Chlorophyll
cpm	Impulse pro Minute
cyt	Cytochrom
DAD	Diaminoduren
BBMIB	Dibromothymochinon
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazon
fd	Ferredoxin
Ferricyanid, Fecy	Kaliumhexacyanoferrat (III)
F_{var}	variable Fluoreszenz
F_o, F_∞	Anfangs- bzw. Maximalniveau der Fluoreszenz
HEPES	N-2-Hydroxy-äthyl-piperazin-N'-2-äthansulfonsäure
MES	Morpholino-äthansulfonsäure
MPS	N-methylphenazonium-3-sulfonat
ox	oxidiert
PC	Plastocyanin
PMS	N-methylphenazonium-methosulfat
PQ	Plastochinon
PS	Photosystem
P_{700}, P_{682}	aktives Pigment von PS I bzw. II
Q	primärer Akzeptor von PS II
red	reduziert
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylendiamin
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X, Z	primärer Akzeptor für PS I bzw. Donator für PS II

1. Einleitung

Auch wenn der Mechanismus des photosynthetischen Elektronentransportes noch immer Gegenstand kontroverser Meinungen ist, so hat sich doch für die Interpretation der meisten Ergebnisse ein Modell bewährt, in dem zwei hintereinandergeschaltete Lichtreaktionen (Photosystem I/II) zusammen mit einer Reihe von bekannten und hypothetischen Redox-Komponenten den Transport von Elektronen vom H_2O zum $NADP^+$ unter Sauerstoffentwicklung vollziehen (HILL und BENDALL, 1960; WITT, 1971; TREBST, 1974; GOVINDJEE und GOVINDJEE, 1975). Im Licht werden durch das Photosystem II Oxidanten produziert, die H_2O oxidieren können. Nach einem Modell von JOLIOT et al. (1969) und KOK et al. (1970) geschieht dies durch die Kooperation von vier positiven Ladungen, die durch vier Photoakte des Systems II erzeugt werden und vermutlich auf einem manganhaltigen Enzym gesammelt werden, ehe sie die Oxidation des H_2O-Moleküls bewirken (RENGER, 1974). Zwischen den Photosystemen wird eine Sequenz von Redox-Komponenten angenommen, der primäre Akzeptor von System II, Q, mit unbekannter chemischer Natur, ein Plastochinon-Pool, sowie Cytochrom f und Plastocyanin. Die Einordnung der beiden letztgenannten Komponenten in das Modell ist noch unsicher. Das aktive Pigment von Photosystem I, P_{700}, kann durch die von System II erzeugten Reduktionsequivalente reduziert werden, wenn es selbst durch eine Photoreaktion oxidiert worden ist. Über den primären Akzeptor von P_{700} und schließlich über Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Reduktase kann $NADP^+$ reduziert werden. Durch den Einsatz von Hemmstoffen oder durch präparative Maßnahmen kann der Elektronentransport an spezifischen Stellen blockiert werden. Es ist

dann möglich durch Verwenden bestimmter artifizieller Elektronendonatoren bzw. Akzeptoren Teilreaktionen aus dem Gesamtelektronentransport zu untersuchen. Für einige Substanzen, wie z.B. die Phenazinabkömmlinge PMS und Pyocyanin (Abb. 2) und das Phenylendiaminderivat DAD ist bekannt, daß sie in ihrer reduzierten Form als Elektronendonatoren und in ihrer oxidierten Form als Elektronenakzeptoren für Photosystem I wirken können. Diese Stoffe können also einen zyklischen Elektronentransport katalysieren.

Neben der Synthese von NADPH aus $NADP^+$ zeigen Thylakoide aus Chloroplasten auch ein lichtabhängige Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat, deren Mechanismus durch verschiedene Hypothesen zu deuten versucht wurde (JAGENDORF, 1975). Die beste experimentelle Grundlage hat die von MITCHELL (1961) aufgestellte chemiosmotische Hypothese. Diese Hypothese setzt eine Membran voraus, die nur wenig durchlässig für Protonen und Hydroxylionen ist, und die einen inneren Raum umschließt. Ferner fordert die Hypothese

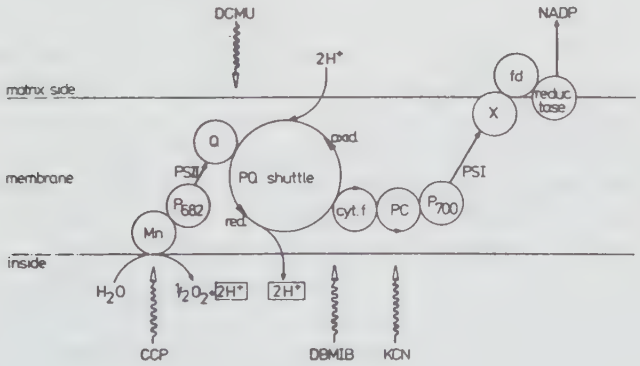


Abb. 1: Schema des offenkettigen Elektronentransportes aus TREBST (1974)

einen vektoriellen Elektronenfluß über die Membran, an den ein Transport von Protonen gekoppelt ist. In dem Schema von Abb. 1 ist die Sequenz des offenkettigen Elektronentransportes mit der Lokalisation der Komponenten in der Thylakoidmembran und den Reaktionsorten der Protonentranslokation gezeigt. Das Schema verknüpft so die Vorstellungen vom linearen Elektronentransport mit den Erfordernissen der chemiosmotischen Hypothese. Für die gezeigte Lokalisation der Elektronentransportkomponenten gibt es Hinweise von verschiedenen methodischen Ansätzen ausgehend (TREBST, 1974).

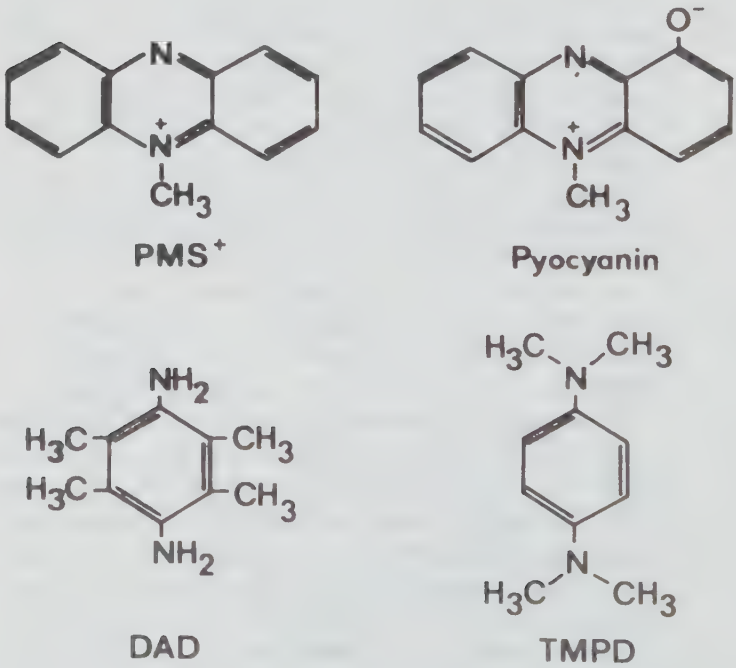


Abb. 2: Strukturformeln für PMS^+, Pyocyanin, DAD und TMPD

Die Energie, die für das Ablaufen der Photosyntheseprozesse nötig ist, stammt aus den Quanten des Lichts, das in den Pigmentsystemen von Chlorophyllen und anderen "akzessorischen" Pigmenten absorbiert wird (SAUER, 1975; PAPGEORGIOU, 1975a). Das Chlorophyll a Molekül geht nach der Absorption eines Quantums oder angeregt durch Energietransfer von einem anderen Pigmentmolekül in einen 1. oder 2. Singulettzustand über, je nach Energieinhalt der Anregung. Moleküle im 2. Singulettzustand fallen unter Wärmeabgabe sehr schnell (10^{-12} sec) in den stabileren 1. Singulettzustand zurück. Von diesem Zustand aus gibt es im Normalfall drei Möglichkeiten des Energieabbaus. Das angeregte Molekül kehrt in den Grundzustand zurück, indem es seine Energie 1) als Wärme, 2) als Lichtquant (Fluoreszenz) abgibt oder 3) an ein anderes Chlorophyll a-Molekül weitergibt bis sie schließlich das photochemisch aktive Pigment des Photosystems erreicht, in dem die die Energie in die chemische Energie der Reaktionsprodukte umgesetzt wird.

Bei Raumtemperatur stammt die Fluoreszenz fast vollständig von den Chlorophyll a- Molekülen des Photosystems II. Das Reaktionszentrum von Photosystem II kann die Energie nur dann für die Ladungstrennungs-Reaktion $ZPQ \xrightarrow{h\nu} \longrightarrow Z^{+}PQ^{-}$ nutzen, wenn es im Grundzustand ZPQ vorliegt (Z und Q sollen den primären Donator bzw. Akzeptor und P das aktive Pigment symbolisieren). Andernfalls wird die Energie in Form von Wärme oder Fluoreszenz abgebaut. Nimmt man an, die Wärmedissipation verhält sich proportional zur Fluoreszenz, so ist zu fordern, daß sich die Fluoreszenz bei gleichbleibender Absorption von Licht antagonistisch zur photochemischen Nutzung der Energie verhält.

In dem von DUYSENS und SWEERS (1963) entwickelten Konzept ist diese Forderung realisiert, indem der Redox-Zustand von Q, dem primären Akzeptor von Photosystem II, als bestimmender Faktor für die Höhe der Fluoreszenz angesehen wird.

Es gibt jedoch auch Beobachtungen, die diesem Konzept zu widersprechen scheinen. So wird z.B. durch die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen, sowohl die Fluoreszenz (HOMANN, 1969; MURATA, 1969) als auch der Elektronentransport stimuliert (RURAINSKI und HOCH, 1972). Dieser Vorgang wird mit einem veränderten Transfer von Energie zwischen den Photosystemen I und II erklärt, der unabhängig vom Redox-Zustand von Q ist (MURATA, 1969; SUN und SAUER, 1971) sondern durch strukturelle Veränderungen der Thylakoide bedingt wird (MURAKAMI et al., 1975).

Eine weitere Möglichkeit die Höhe der Fluoreszenz zu beeinflussen ist durch die Anwesenheit von Molekülen gegeben, die dadurch die Fluoreszenz löschen, daß sie mit dem angeregten Chlorophyll-Molekül interagieren. In diesem Fall geht schließlich die Energie durch Wärmeabgabe verloren. Ein derartiger Quench der Fluoreszenzemission wurde für eine Reihe von aromatischen Verbindungen gefunden.

Seit längerem wird diskutiert, daß auch ein Hoch-Energie-Zustand von Thylakoidmembranen, der in Beziehung zur Photophosphorylierung steht, die Höhe der Chlorophyll-Fluoreszenz beeinflussen kann. In diesem Sinne wurde von ARNON et al. (1965) und von HEATH und PACKER (1968) ein Quench der Emission bei Anwesenheit des Kataysators des zyklischen Elektronentransportes, PMS, interpretiert. Da in diesen Experimenten kein Hemmstoff des Elektronentransportes anwesend war, ist jedoch eine Akzeptorwirkung von PMS

und somit eine Änderung des Redoxzustandes von Q nicht auszuschließen. Von MURATA und SUGAHARA (1969) wurde dann aber gezeigt, daß auch bei DCMU-vergifteten Chloroplasten ein lichtinduzierter Quench bei Anwesenheit von PMS zu beobachten ist. Der Effekt wurde mittels eines Hochenergiezustandes der Membranen erklärt, zumal er durch Entkoppler hemmbar war. Die Hypothese des 'Hoch-Energie-Quenches' wurde weiter unterstützt durch Arbeiten von WRAIGHT und CROFTS (1971), die dasselbe Phänomen im DAD-System fanden und von COHEN und SHERMAN (1971), die eine strikte Korrelation des DAD-induzierten Quenches zum Protonengradienten zeigten. Von MOHANTY et al. (1973) und PAPGEORGIOU (1975) wurde der PMS-induzierte Quench ebenfalls im Zusammenhang mit einem Hoch-Energie-Zustand gesehen; PAPAGEORGIOU (1975) berichtet jedoch gleichzeitig über eine Fluoreszenz-Löschung, die möglicherweise durch Interaktion von PMS mit dem angeregten Chlorophyll-Molekülen bedingt ist. SLOVACEK und BANNISTER (1976) zweifeln die Hypothese des Hoch-Energie-Quenches an, da sie keine Korrelation zwischen dem Quench im PMS-System und dem Protonengradienten fanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der PMS-induzierte Quench der Fluoreszenz untersucht und festgestellt, daß zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Quench zu beobachten ist, der nicht durch einen Hoch-Energie-Zustand der Membranen erklärt werden kann. Vielmehr zeigte sich eine Korrelation des Quenches zu einer Absorptionsabnahme von PMS, die mit großer Wahrscheinlichkeit durch das (gezeigte) Binden von PMS an die Thylakoidmembranen erklärt werden kann. Ein nicht-lichtinduziertes Löschen der Fluoreszenz durch die oxidierten und reduzierten Phenazinderivate PMS und Pyocyanin wurde beobachtet, wobei die Effektivität des Quenches mit der Lipophilizität der Stoffe korre-

lierte. Der Vorgang wird mit einer Interaktion der Phenazine mit angeregtem Chlorophyll erklärt, und der Einfluß der Lipophilizität so gedeutet, daß sie das Ausmaß der Penetrationsfähigkeit der Phenazine in die Membranen an der Ort der Emission bestimmt. In diesem Sinne wird auch ein Zusammenhang zwischen der lichtinduzierten Bindung von oxidiertem PMS und dem Fluoreszenz-Quench gesehen.

Die Interpretation des Fluoreszenz-Quenches im DAD-System vereinbart sich auch nach den hier gezeigten Ergebnissen mit der Hypothese des Hochenergie-Quenches. Eine lichtinduzierte Fluoreszenz-Löschung bei Anwesenheit von TMPD wird gezeigt, jedoch kann dieser Effekt vorerst nicht gedeutet werden.

PMS interagiert nach den vorliegenden Ergebnissen auch direkt mit Photosystem II. Seit längerem wird zur Deutung von Lumineszenz-Vorgängen (LAVOREL, 1975) aber auch zur Deutung der Restoration der Fluoreszenzinduktion in DCMU-vergifteten Chloroplasten (HEBER und FRENCH, 1968) eine Rückreaktion von Photosystem II gefordert ($Z^{+}PQ^{-} \longrightarrow ZPQ$). Anhand von Messungen der Rückreaktion wird gezeigt, daß reduziertes PMS als Donator für Photosystem II wirken kann, und oxidiertes PMS unter speziellen Bedingungen möglicherweise eine Akzeptorfunktion besitzt.

2. Material und Methoden

2.1. Anzucht der Pflanzen

Als Versuchsmaterial wurde Pisum sativum (cv. kleine Rheinländerin) verwendet, das im Gewächshaus auf 'Vermiculite' oder auf Einheitserde angezogen wurde. In den Wintermonaten wurden die Pflanzen zusätzlich zum Tageslicht mit Leuchtstoffröhren beleuchtet. Für die Experimente wurden 3-6 Wochen alte Pflanzen geerntet.

2.2. Isolation der Chloroplasten

Von den Pflanzen wurden die turgeszenten Blätter abgezupft und in einem vorgekühlten Mörser mit wenig Isolationsmedium zerrieben. Das Medium enthielt 0.4 M Saccharose, 10 mM NaCl und 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Die zerriebenen Blätter wurden durch ein engmaschiges Nylonnetz abgequetscht. Die so gewonnene Suspension wurde auf einer Christ-Tischzentrifuge 90 sec bei 3500 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment in wenig Suspensionsmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde durch einen Glaswollpfropfen gefiltert. Das Filtrat wurde auf einen Chlorophyllgehalt von ca. 1 mg/ml eingestellt, in Eis aufbewahrt und diente als 'Chloroplastensuspension' für die Messungen.

Die Chlorophyllkonzentration wurde nach ARNON (1949) bestimmt.

2.3. Präparation von Tris-gewaschenen Chloroplasten (nach YAMASHITA und BUTLER, 1969)

Isolierte Chloroplasten wurden abzentrifugiert, in 0,8 M Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert und auf Eis gehalten.

Bei 'Kontrollen' wurde anstelle von 0,8 M Tris das Isolationsmedium verwendet. Die Chlorophyllkonzentration während der Behandlung war 0,1 mg/ml. Nach 10 min. wurden die Suspensionen abzentrifugiert und in soviel Isolationsmedium resuspendiert, daß die Chlorophyllkonzentration ca. 1 mg/ml war.

2.4. Präparation von trypsin-behandelten Chloroplasten

Isoliert Chloroplasten wurden bei Raumtemperatur in einem Reaktionsansatz von 0,9 ml mit Trypsin (TPCK-behandelt) inkubiert, der folgende Zusammensetzung hatte:

50 mM Saccharose
5 mM NaCl
25 mM Tricin/NaOH pH 8,0
0,16 mg/ml Trypsin
Chloroplasten entsprechend
0,51 mg/ml Chlorophyll

Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde die Proteolyse mit einer der Trypsinmenge entsprechenden Menge an Trypsininhibitor gestoppt.

2.5. Der Reaktionsansatz

Das Basis-Reaktionsmedium enthielt

0,1 M Saccharose
10 mM NaCl
20 mM Tricin/NaOH pH 8,0

Zusätze zu diesem Medium sind in den Legenden zu den Abb. und Tab. angegeben. DCMU, Gramicidin, CCCP und Nigericin wurden als methanolische Lösungen verwendet.

Die Methanol-Endkonzentration lag stets unter 0.8 % v/v. Die PMS-Lösung wurde täglich frisch hergestellt und im Dunkeln aufbewahrt. Pyocyanin wurde von Herrn R. Schopf nach der Methode von JAGENDORF und MARGULIES (1960) hergestellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Nach dem Pipettieren des Reaktionsansatzes im Dämmerlicht wurde die Küvette vor der Messung mindestens 2 min. in vollständiger Dunkelheit gehalten.

2.6.1. Fluoreszenzmessungen bei kontinuierlicher Belichtung

Die Messung von Fluoreszenz-Induktionskurven und von längerfristigen Fluoreszenzänderungen erfolgten in einem nicht-kommerziellen Spektrophotometer (Blockdiagramm, Abb.3). Das Anregungslicht, das gleichzeitig zur Anregung von photochemischen Reaktionen und der Fluoreszenz diente, kam von einer 150 W Halogenlampe. Der Lichtstrahl wurde durch eine Sammellinse gebündelt und passierte in der angegebenen Reihenfolge, Wärmeschutzfilter (Schott, KG 3), einen Photoverschluß (Compur) und einen Interferenzfilter (Schott, DIL 595) mit einem Transmissionsmaximum bei 595 nm und mit einer Halbbandbreite von 10 nm, bevor er auf die Küvette auftraf. In einigen Experimenten wurde anstelle des DIL 595-Filters ein Breitbandinterferenzfilter (Balzers, K 5), der zwischen 570 und 620 nm transmittierte, verwendet. Die Lichtintensität wurde mit Hilfe von Neutralfiltern (Balzers) variiert. Der Photoverschluß benötigte 3 msec zum vollständigen Öffnen bzw. Schließen. Die Emission wurde mittels eines Photovervielfachers (RCA C 7164 R) gemessen. Zum Schutz vor gestreutem Anregungslicht befand sich vor dem Photovervielfacher ein Interferenzfilter(Schott DIL 687) mit einem Transmissionsmaximum

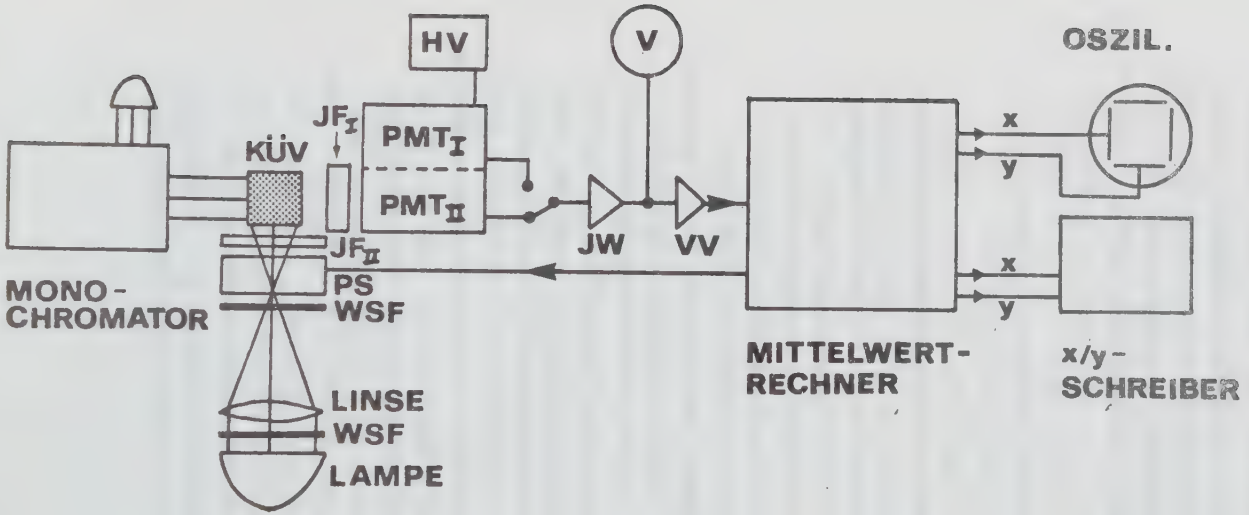


Abb. 3: Blockdiagramm der Meßapparatur

Die Abkürzungen bedeuten: KÜV = Küvette; IF = Interferenzfilter; PS = Photoverschluß; WSF = Wärmeschutzfilter; HV = Hochspannungsnetzgerät; PMT= Photovervielfacher; IW = Impedanzwandler; V = Voltmeter; VV = Vorverstärker; OSZIL = Oszilloskop.

bei 687 nm und einer Halbbandbreite von 10 nm, sowie ein Breitbandinterferenzfilter (Balzers K 7) mit maximaler Transmission zwischen 670 und 720 nm.

Das Signal gelangte über einen Impedanzwandler und einen Vorverstärker (1/10) in einen Mittelwertrechner mit 1024 Kanälen (Nicolet), in dem es gespeichert wurde. Mittels eines Oszilloskops wurde das Signal sichtbar gemacht und durch einen x/y-Schreiber (Philips) aufgezeichnet. Der Schreiber wurde durch den Mittelwertrechner so gesteuert, daß bei schnellen Änderungen in y-Richtung die Abschreibgeschwindigkeit in x-Richtung herabgesetzt wurde. Das Öffnen des Photoverschlusses wurde durch ein Triggersignal ausgelöst, das vom Mittelwertrechner beim Durchlaufen von Kanal 32 abgegeben wurde.

2.6.2. Fluoreszenzmessung innerhalb kurzer Lichtperioden

Zur Messung der Rückkehr der Fluoreszenz im Dunkeln nach vorangegangener Belichtung und zur Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens während der Reduktion von oxidiertem PMS konnte kein Dauerbelichtung gegeben werden. In diesen Fällen wurde die Emission in der gleichen Anordnung gemessen wie oben beschrieben, jedoch wurden zur Anregung in bestimmten zeitlichen Abständen kurze Lichtperioden gegeben, in denen die Emission registriert wurde. Dabei wurde der Photoverschluß jeweils von Hand ausgelöst. Die digitale Funktionsweise des Mittelwertrechners bringt mit sich, daß die Dauer der Lichtperioden größer als das Meßintervall für einen Meßpunkt sein mußte, um sicher zu sein, daß während einer Lichtperiode mindestens ein Meßpunkt registriert wurde.

2.6.3. Messung von Fluoreszenz-Induktionskurven und der Kinetik ihrer Dunkel-Restoration

Die Meßanordnung ist unter 2.6.1. beschrieben. Zur Auswertung wurde bei einigen Experimenten die Fläche über den Induktionskurven herangezogen. Hierzu wurden die Flächen aus den Schreiberaufzeichnungen ausgeschnitten und auf einer Analysenwaage gewogen.

Bei Untersuchungen der Kinetik der Restoration des Induktionsverlaufes war es nötig, 125 msec bis 200 sec nach einer Erstbelichtung eine Induktionskurve zu messen. Dabei mußte verhindert werden, daß der Mittelwertrechner das Signal der Erstbelichtung registrierte, sondern vielmehr zur Messung des Signals der Zweitbelichtung bereitstand. Das Problem wurde gelöst mit den verfügbaren Geräten, die in der angegebenen Schaltung (Abb. 4) miteinander kombiniert wurden *).

2.7. Messung von lichtinduzierten Transmissionsänderungen

Durch Verschieben der Photovervielfacher-Aufnahme (siehe Blockdiagramm, Abb. 3) konnte ein zweiter Photovervielfacher (RCA 4518) vor die Küvette gebracht werden, dessen spektrale Empfindlichkeit zur Erfassung der Transmissionsänderungen geeignet war. Das Meßlicht kam aus einem Gittermonochromator (Bausch und Lomb 500 mm) und hatte bei allen verwendeten Wellenlängen eine Halbbandbreite von kleiner als 1,5 nm.

---

*) An dieser Stelle sei Herrn Gerd Mader gedankt, der neben dieser Schaltung eine Reihe von Geräten entwickelte und damit sehr zum Aufbau der Apparatur beigetragen hat.

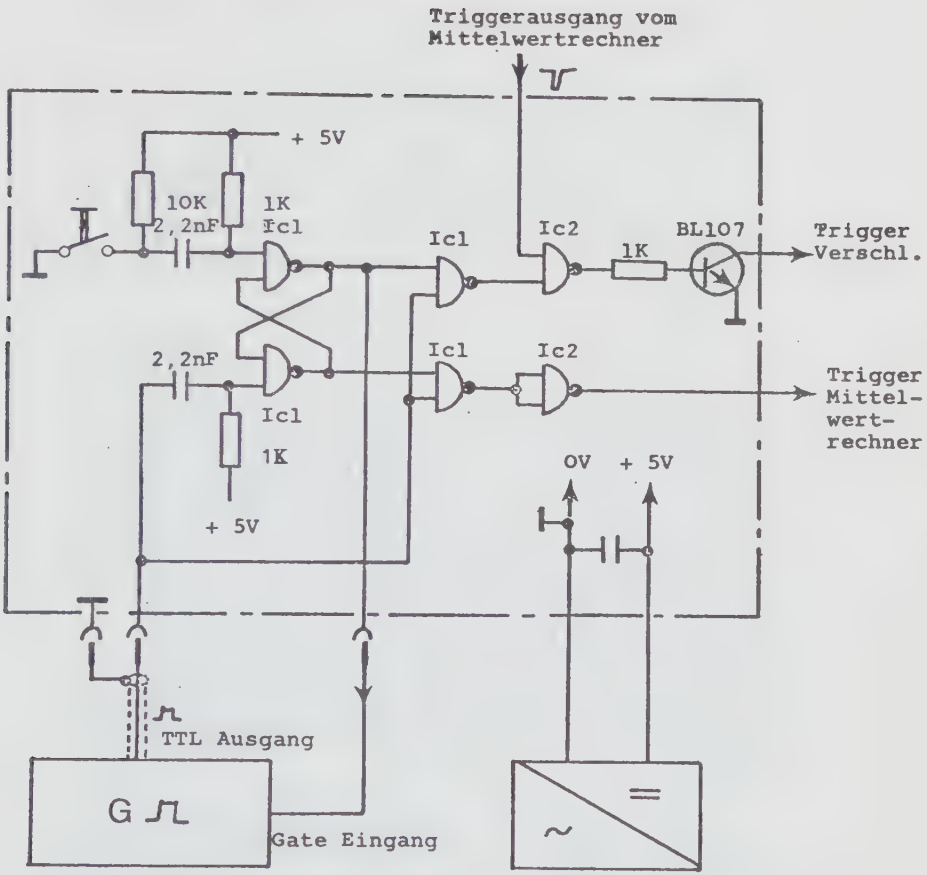


Abb. 4: Schaltung zur Messung der Dunkelrestoration der Fluoreszenzinduktion

Zur Messung der Transmissionsänderungen im Bereich von 370-400 nm wurde das gleiche Anregungslicht verwendet wie unter 2.6. beschrieben. Die Transmissionsänderungen bei 585 nm, die als Hinweise für Volumenänderungen der Chloroplasten gewertet wurden, diente rotes Licht > 660 nm (Schott, RG 660). In jedem Fall wurde der Photovervielfacher durch einen engbandigen Interferenzfilter (Schott, DIL), der das Meßlicht transmittieren ließ, gegen gestreutes Anregungslicht geschützt.

Die Grundtransmission (I) des Meßlichtes wird durch eine bestimmte Spannung (V_g), eine lichtinduzierte Transmissionsänderung (ΔI) durch eine Spannungsänderung (ΔV) gemessen. Es wurde überprüft, daß die Transmission und die Spannung am Photovervielfacherausgang innerhalb des Meßbereiches linear korrelierten. Um zu erreichen, daß nur (ΔV) elektronisch verstärkt wird, wurde innerhalb des Impedanzwandlers eine Spannungskompensation von V_g (das der Grundtransmission entspricht) durchgeführt und mit einem Digital-Voltmeter überprüft. Zur Regelung eines bestimmten Wertes von V_g wurde die Hochspannung am Photovervielfacher variiert.

Die Auswertung erfolgte über die Meßgrößen V_g und ΔV, da gilt: $\Delta V/V_g = \Delta I/I$. Aus $\Delta I/I$ konnte unter Verwendung der Gesetze von LAMBERT und BEER und bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten eine dem Wert $\Delta I/I$ entsprechende Konzentrationsänderung berechnet werden.

2.8. Messung des Elektronentransportes durch P_{700}

Messungen von P_{700}, dem photochemisch aktiven Pigments des Photosystem I, wurden in einem Relaxationsspektrophotometer durchgeführt (HOCH,1972; RURAINSKI, 1975). Mit dieser Methode kann innerhalb bestimmter Grenzen die Relaxationszeit für die Reduktion von P_{700} und der Elektronenfluß durch das Pigment berechnet werden.

2.9. Messung der lichtinduzierten Bindung von PMS an die Membranen

Die Bindungsstudien wurden in Polyäthylenbechern (1,5 ml), deren Verschlußkappen abgeschnitten waren,und die in eine Tischzentrifuge (Eppendorf 2000) paßten, durchgeführt. Der Reaktionsansatz (1 ml) wurde mit gelbem Licht (Balzers, K 5) 1 min belichtet und dann 45 sec im Licht abzentrifugiert. Vom Überstand wurden sofort 0,5 ml abgenommen, und die Extinktion bei 388 nm (Absorptionsmaximum von PMS) gemessen. Dunkelkontrollen wurden analog behandelt. Aus den Extinktionsdifferenzen zwischen 'Licht'-und 'Dunkelproben' wurde die lichtinduzierte Bindung von PMS berechnet. Als Extinktionskoeffizient wurde der Wert 23,8 $mM^{-1}cm^{-1}$ (JAGENDORF und MARGULIES, 1960) genommen. Die Reversibilität der Bindung wurde dadurch gezeigt, daß nach der Belichtung eine Dunkelzeit von 1 min eingeschaltet wurde, bevor im Dunkeln abzentrifugiert wurde.

2.10. Messung der Photophosphorylierung

Die Photophosphorylierung wurde über den Einbau von ^{32}P markiertem Orthophosphat in ATP bestimmt. Die Reaktion wurde bei 20^{o} C durchgeführt und nach

Belichtungszeit von 2 min mit 0,5 ml 20% TCA gestoppt. Der Reaktionsansatz von 2,5 ml enthielt:

0,1 M Saccharose
10 mM NaCl
4 mM $MgCl_2$
2 mM Na_2HPO_4 (markiert mit ca. 10^6 cpm ^{32}P)
2 mM ADP
30 µM PMS
40 µM DCMU

Die Chloroplastenmenge entsprach ca. 20 µg/ml Chlorophyll. AT^{32}P wurde nach der Methode von LINDBERG und ERNSTER (1956) bestimmt. Vom agestoppten und abzentrifugierten Reaktionsgemisch wurden 0,1 ml zum Zählen der eingesetzten Menge an Radioaktivität und 0,5 ml zum Bestimmen von AT^{32}P abgenommen. Der Bestimmungsansatz (4 ml) enthielt außerdem: 1,25% Ammoniummolybdat und 1,25 N H_2SO_4. Die wäßrigen Zusätze waren mit Isobutanol/Benzol (1/1) gesättigt. Der Ansatz wurde dreimal nach Zusatz von 20 µl einer nichtradioaktiven 0,1 M Phosphatlösung mit 5 ml Isobutanol/Benzol (1/1), das wassergesättigt war, ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde jeweils abgesaugt, und von der zuletzt verbleibenden wäßrigen Phase wurde 1 ml in ein Zählfläschchen überführt, das 10 ml H_2O enthielt. Das in der wäßrigen Phase zurückgebliebene AT^{32}P wurde im Szintillationszähler mittels der Cerenkov-Strahlung (HOFFMANN, 1965) bestimmt.

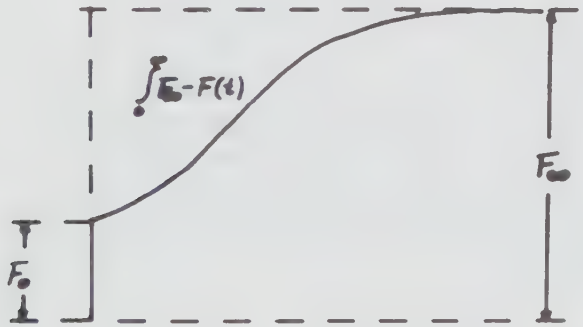
2.11. Chemikalien

ADP wurde von der Firma Boehringer u. Söhne, Mannheim, DCMU und Puffersubstanzen wurden von der Firma Serva, Heidelberg, PMS und CCCP von der Firma Sigma, St. Louis, USA, ^{32}P-Orthophosphat von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig und Trypsin, Trypsininhibitor und Glucoseoxidase von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Alle anderen Substanzen waren p.a. Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Deutung von Fluoreszenz-Induktions-Kurven

In Chloroplasten ist bei Belichtung mit einer geeigneten Lichtintensität und bei Messung auf geeigneten Zeitskalen eine typische Induktionskurve der Fluoreszenz zu beobachten. Nach Einsetzen der Belichtung findet ein sehr schneller Anstieg der Emission bis zu einem Wert F_o statt. Danach steigt die Emission bei vorverdunkelten Chloroplasten mit einem charakteristischen sigmoiden Verlauf bis zu einem maximalen Wert F_∞ an.



Der Zusammenhang der beobachteten Fluoreszenzinduktionskurven mit dem photosynthetischen Elektronentransport wurde durch eine Hypothese von DUYSENS und SWEERS (1963) hergestellt, deren Grundkonzept heute noch gültig ist. Nach dieser Hypothese reflektiert die Höhe der variablen Fluoreszenz $(F_\infty - F_o)$ zu einem bestimmten Zeitpunkt das Ausmaß einer lichtabhängigen Reduktion von quenchenden

Zentren (Q) in nichtquenchende Zentren (Q^-).

$$Q \xrightarrow{h\nu} Q^-$$

Wenn diese Umwandlung einmal erfolgt ist, findet keine photochemische Verwendung der absorbierten Quanten mehr statt, woraus eine erhöhte Fluoreszenz des Pigmentsystems resultiert. Die Fläche über der Induktionskurve, die bei Raumtemperatur größer ist als bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs (KOK et al., 1966), ist ein Maß für die Größe eines Pools an Oxidanten, die im Licht reduziert werden. Der Temperatureffekt ist also so zu deuten, daß bei Raumtemperatur ein Pool von sekundären Akzeptoren (A) Q^- so lange reoxidieren, bis sie selbst reduziert vorliegen. In gleicher Weise ist zu interpretieren, daß in Abhängigkeit von einer Dunkelzeit nach vorangegangener Belichtung die Induktion der Emission wiederhergestellt wird. Durch fern-rotes Licht wird diese Restoration wesentlich beschleunigt, wodurch angezeigt wird, daß die Oxidation von Q^- und des reduzierten sekundären Akzeptor-Pools aus Richtung Photosystem I erfolgt.

Bei Anwesenheit von Hillakzeptoren wie z. B. Ferricyanid (Abb. 5) und bei gemäßigten Intensitäten des Anregungslichtes erreicht die Emission nicht F_∞. Unter diesen Bedingungen werden also die primären und sekundären Akzeptoren auf einem relativ oxidiertem Niveau gehalten.

Bei Gegenwart von DCMU erreicht die Emission sehr schnell F_∞ (Abb. 5), die Fläche über der Induktionskurve wird auf etwa 1/10 der ursprünglichen

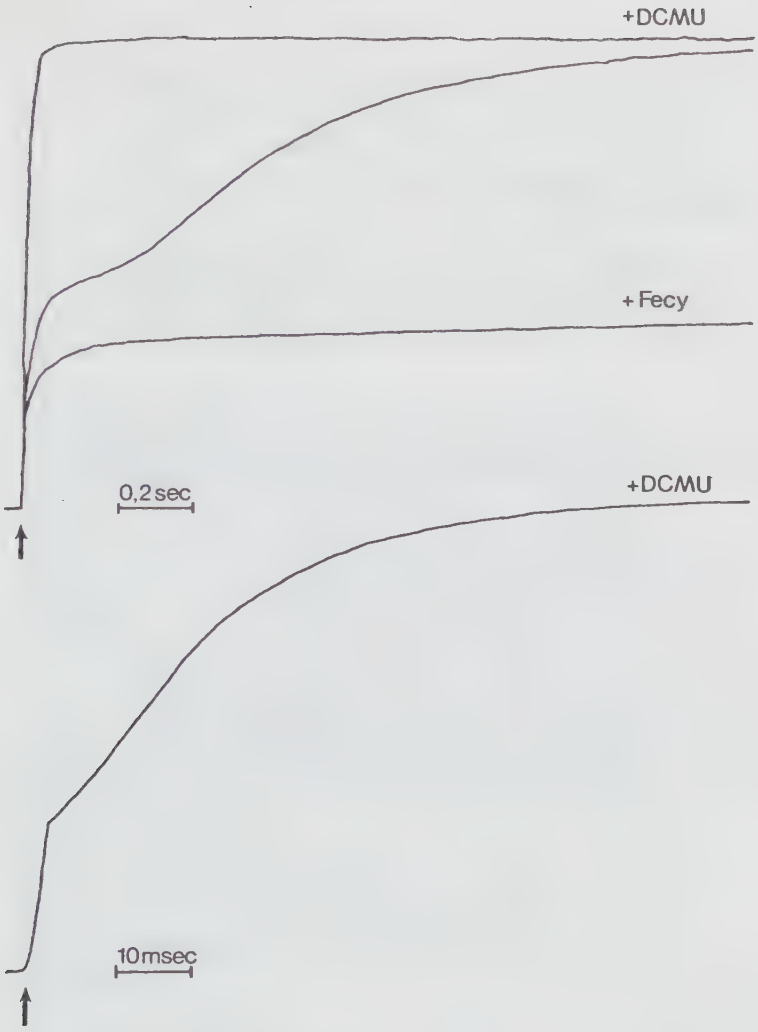


Abb. 5: Der Einfluß von DCMU und von Ferricyanid auf die Fluoreszenzinduktion

Zusätze zum Reaktionsmedium (s. 'Methoden'): 5 mM $MgCl_2$, Chloroplasten (8 ug Chl/ml) und wo angegeben 10 uM DCMU, 0,8 mM Ferricyanid
Anregungslicht: 595 nm (Schott DIL 595 Filter) $3,2 \times 10^4$ erg/cm^2sec.
Zu beachten sind die unterschiedlichen Zeitskalen.

Fläche verkleinert (KOK et al., 1966). Das Ergebnis wird dahingehend interpretiert, daß durch DCMU der Elektronentransport zwischen Q und dem Pool an sekundären Akzeptoren (A) blockiert wird (DUYSENS, 1964).

Bei Abwesenheit von DCMU repräsentiert also die Fläche über der Induktionskurve eine Konzentration von Q + A, bei Anwesenheit des Hemmstoffs nur von Q.

Auf diesen Annahmen basierend wurden Stoichiometrien für Q und A zur Gesamtmenge an Chlorophyll errechnet:

(Q + A)/Chl = 1/20 bis 1/60
(KOK, 1963; MALKIN und KOK, 1966)
Q/Chl = 1/500 (KAUTSKY et al., 1960)

Die errechnete Menge an Q + A ist vereinbar mit den Befunden von DE KOUCHKOVSKY (1963) und JOLIOT (1965), wonach der O_2-Ausstoß unmittelbar nach Einsetzen der Belichtung 1 O_2/150 Chl ≙ 1 eq/40 Chl ist.

3.2. Der Einfluß von Mg^{2+}-Ionen und von PMS auf die Fluoreszenz

Es wurde gezeigt, daß außer dem Redoxzustand von Q andere Parameter die Höhe der variablen Fluoreszenz beeinflussen können (HOMANN, 1969; MURATA, 1969; BONAVENTURA und MYERS, 1969; WRAIGHT und CROFTS, 1970; JOLIOT et al., 1971; DELOSME, 1971; BUTLER et al., 1973).

In ihrer einfachsten Form fordert die Redox-Quencher-Hypothese (DUYSENS und SWEERS, 1963) ein antagonistisches Verhalten der Fluoreszenz und des Elektronentransportes. Mg^{2+} und andere zweiwertige Kationen jedoch erhöhen beträchtlich die variable Fluoreszenz (HOMANN, 1969; MURATA, 1969) (Abb. 6a) bei einem ebenfalls stimulierten Elektronentransport (RURAINSKI und HOCH, 1972).

Da Mg^{2+} auch bei Anwesenheit von DCMU die Emission erhöht, kann der Effekt nicht über den Redoxzustand von Q erklärt werden. Vielmehr wurde der Einfluß von Mg^{2+} über einen veränderten Energietransfer zwischen den Photosystemen interpretiert (MURATA, 1969, 1971; MURATA et al., 1970; SUN und SAUER, 1971) oder eine Erhöhung der Zahl der aktiven Reaktionszentren angenommen (RURAINSKI und HOCH, 1972).

Als primäre Ursache für eine erhöhte Quantenausbeute von Photosystem II nach Mg^{2+}-Zugabe werden strukturelle Veränderungen der Membranen diskutiert (MURATA, 1972). Derartige Strukturänderungen durch zweiwertige Kationen, die eher elektrostatischer als osmotischer Natur sind, sind seit längerer

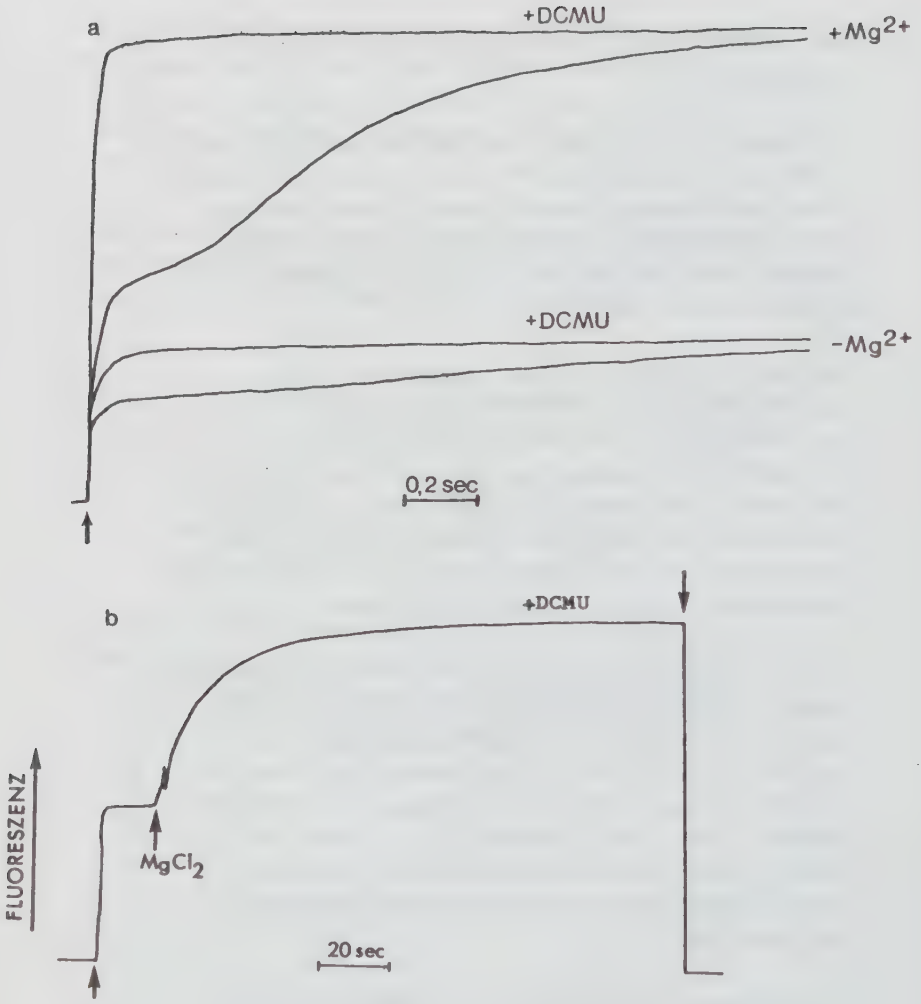


Abb. 6: Der Einfluß von Mg^{2+} auf die Fluoreszenz

Zusätze zum Reaktionsmedium: Chloroplasten (8 µg Chl/ml) und wo angegeben 5 mM $MgCl_2$, 10 µM DCMU.
a) Fluoreszenzinduktion nach einer Dunkelinkubation von 2 min.
b) Verlauf der Fluoreszenzerhöhung nach Mg^{2+}-Zugabe. Die Unterbrechung in der Kurve zeigt das Mischen nach der Zugabe von $MgCl_2$ an. Anregungslicht wie in Abb. 5.

Zeit bekannt (GROSS und PACKER, 1967).

Wie Abb. 6b zeigt, erreicht die Fluoreszenz (in Gegenwart von DCMU) nach Mg^{2+}-Zugabe erst nach ca. 1,5 Minuten ihren Maximalwert. Aus diesem Grunde wurde bei allen Experimenten eine Dunkelinkubation der Chloroplasten im Reaktionsmedium von mindestens 2 Minuten eingehalten.

Bei Abwesenheit von DCMU zeigt PMS einen ähnlichen Einfluß auf die Fluoreszenz (Abb. 7a) wie z. B. Ferricyanid. Die dadurch angedeutete Akzeptorwirkung von PMS vereinbart sich mit dem gegenwärtigen Konzept über die Rolle von PMS in der Photophosphorylierung (HAUSKA et al., 1969).

Von MURATA und SUGAHARA (1969) wurde ein lichtinduzierter Quench der Fluoreszenz bei Gegenwart von DCMU und PMS beschrieben. Liegt in einem Reaktionsansatz PMS ausschließlich in reduzierter Form vor, findet ein Quench der Emission statt, der nicht durch Anregungslicht induziert werden muß (SCHMIDT, 1975).

In Abb. 7 b sind diese beiden Beobachtungen nochmals dargestellt; sie werden in den folgenden Kapiteln eingehender untersucht.

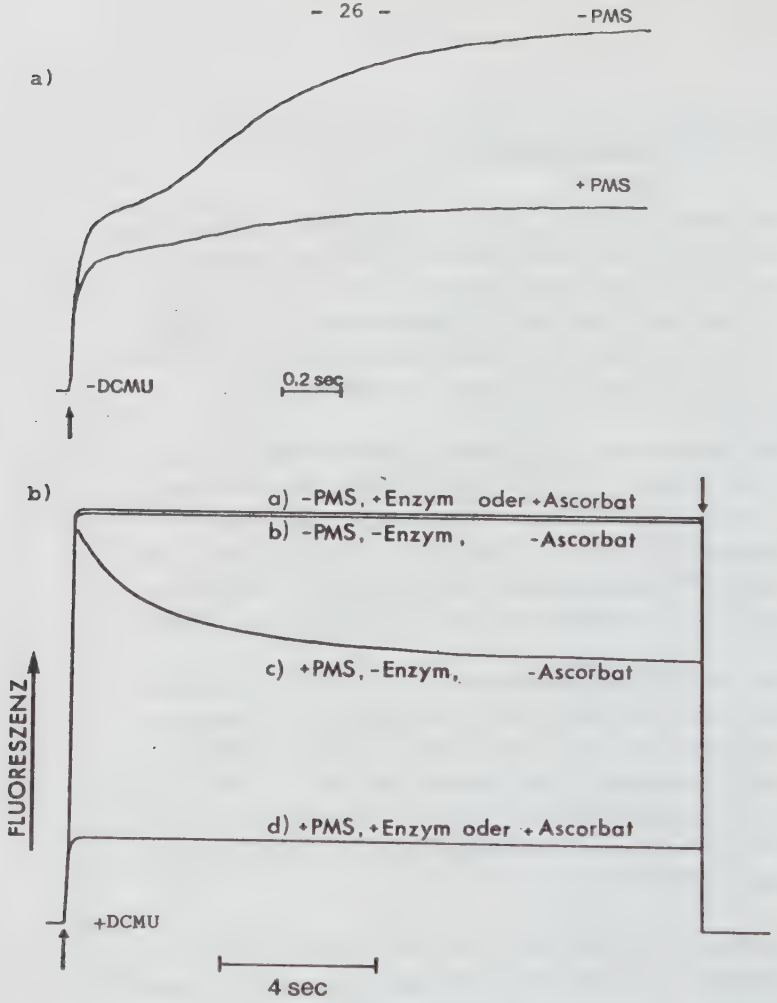


Abb. 7: Der Einfluß von oxidiertem und reduziertem PMS auf die Fluoreszenz.

Zusätze zum Reaktionsmedium: 5 mM $MgCl_2$, Chloroplasten (8 ug Chl/ml) und nach Angabe 20 uM PMS, 10 uM DCMU, 5 mM Ascorbat und ca. 1 Einh./ml Glucoseoxidase (bezeichnet als Enzym). In b) ist 10 mM Glucose anwesend. Die Reduktion von PMS mittels Glucose/Glucoseoxidase ist unter 3.3 beschrieben. Dunkelinkubation: in a) 2 min in b) 5 min. Messungen für b) erfolgten in Thunbergküvetten. Anregungslicht wie in Abb. 5.

3.3. Der Einfluß von reduziertem PMS auf die Chlorophyllfluoreszenz

3.3.1. Die Reduktion von PMS

Um eine schnelle und vollständige Reduktion von PMS zu erreichen, wird gewöhnlich ein Überschuß an Ascorbat als Reduktionsmittel verwendet. Unter aeroben Bedingungen führt diese Reaktion zu einem Verbrauch an Sauerstoff, da PMSH autoxidabel ist (SLOVACEK und BANNISTER, 1976). Wie im Folgenden gezeigt wird, läßt sich PMS auch enzymatisch über das Flavinenzym Glucoseoxidase reduzieren, wenn Glucose als Reduktant anwesend ist. Glucose/Glucoseoxidase wird häufig zur Herstellung von strikter Anaerobiose in einem Reaktionsgefäß verwendet (KOK et al., 1965). Dabei wird O_2 durch Glucose über das Flavin der Glucoseoxidase reduziert und es entsteht H_2O_2 und Gluconsäure.

Schon seit langem wird PMS als artifizieller Akzeptor für die mitochondriale Atmungskette verwendet (KEARNEY und SINGER, 1956). Da diese Reduktion von PMS über ein Flavinenzym stattfindet, ist anzunehmen, daß die Reduktion über die Glucoseoxidase in einer dazu analogen Reaktion verläuft. Die Geschwindigkeit der O_2-Reduktion während der Glucose/Glucoseoxidase-Reaktion wird bei Gegenwart von PMS deutlich herabgesetzt. Offensichtlich konkurriert also PMS mit dem Sauerstoff im Reaktionsansatz um den Reduktanten Glucose.

Die Reduktion durch Ascorbat oder durch Glucose/Glucoseoxidase führt, soweit dies die Absorptions-

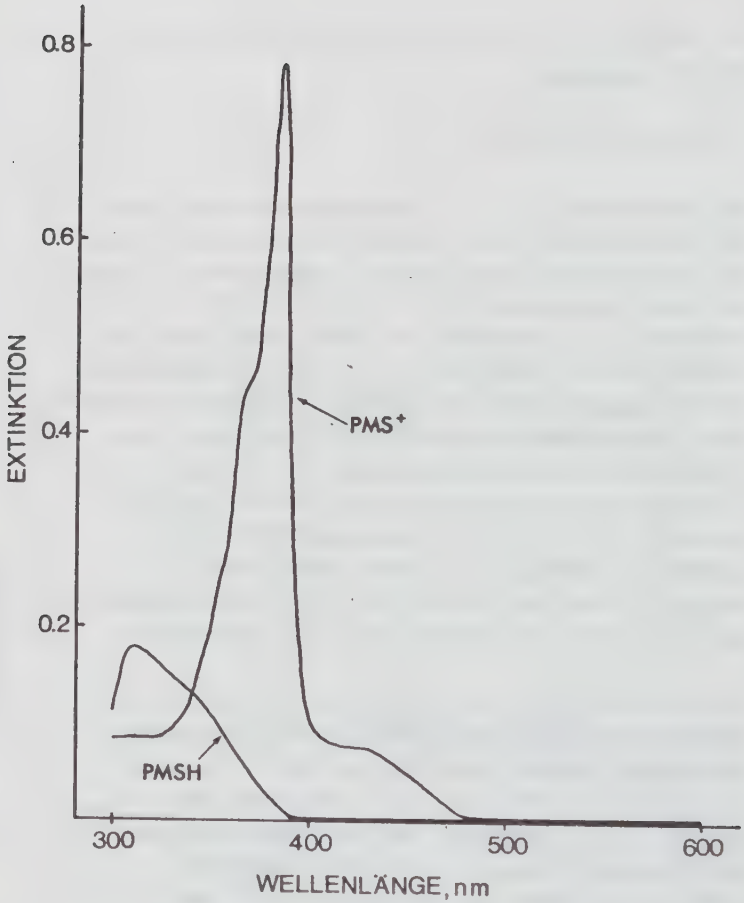


Abb. 8: Absorptionsspektren von oxidiertem und reduziertem PMS

Thunbergküvetten aus Quarzglas enthielten zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 mM Glucose, 30 uM PMS und 5 mM Ascorbat oder ca. 1 Einh./ml Glucose oxidase. Mit beiden Reduktionsmitteln wurden identische Spektren für PMSH gemessen.
Die Messungen erfolgten in einem Shimadzu UV 2000 Spektrophotometer.

spektren anzeigen (Abb. 8), zu den selben Reaktionsprodukten. Die Reaktionen lassen sich also folgendermaßen formulieren.

$$PMS^+ + \text{Ascorbat} \longrightarrow PMSH + \text{Dehydroascorbat}$$

$$PMS^+ + \text{Glucose} \xrightarrow[\text{Oxidase}]{\text{Glucose}} PMSH + \text{Gluconsäure}$$

Bei Verwendung von etwa 1 Einheit/ml Glucoseoxidase wurde unter den gegebenen Bedingungen das vorhandene PMS in etwa 5 Minuten vollständig reduziert (Abb. 9).

3.3.2. Die Fluoreszenzabnahme im Verlauf der PMS-Reduktion

Unter 3.2. wurde bereits dargestellt, daß die Fluoreszenz-Emission durch reduziertes PMS stark herabgesetzt wird. In diesem und den folgenden Kapiteln soll eine quantitative Beziehung zwischen der Konzentration an reduziertem PMS und dem Fluoreszenzquench hergestellt werden.

Wie Abb. 10 zeigt, spiegelt sich die fortschreitende PMS-Reduktion nach Zugabe des Enzyms in einer Abnahme der Fluoreszenz wider. Auch die charakteristische lag-Phase nach der Enzymzugabe kommt in der Fluoreszenzabnahme zum Ausdruck. Bei Versuchen wie in Abb. 10 konnte keine kontinuierliche Belichtung gegeben werden, da bei Anwesenheit von oxidiertem PMS ein lichtinduzierter Quench stattfindet (siehe Abb. 7b). Zu diesem Zweck wurde die Emission während kurzer Lichtperioden registriert,

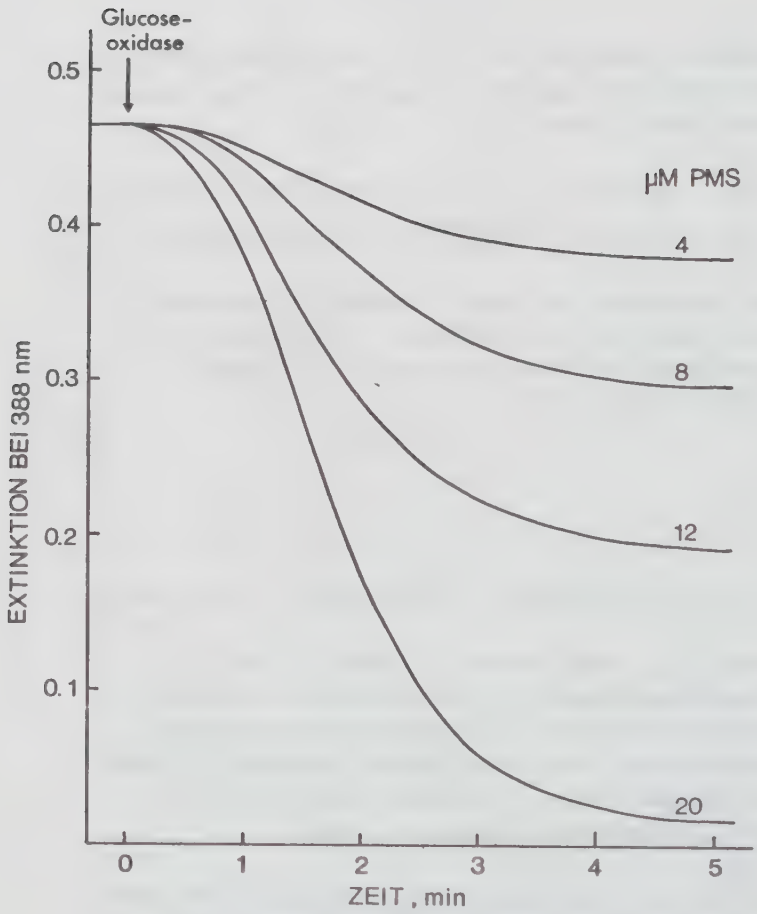


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der PMS-Reduktion mit Glucose/Glucoseoxidase

Thunbergküvetten enthielten zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 mM Glucose 4; 8; 12; 20 µM PMS. Zum Zeitpunkt "0" wurde Glucoseoxidase vom Seitenarm in den Küvettenraum überführt. Die Endkonzentration war c. 1 Einh./ml. Vier Schreiberkurven entsprechend den vier PMS-Konzentrationen sind überlagert dargestellt. Unterbrechungen in Kurven beim Schütteln sind vernachlässigt.

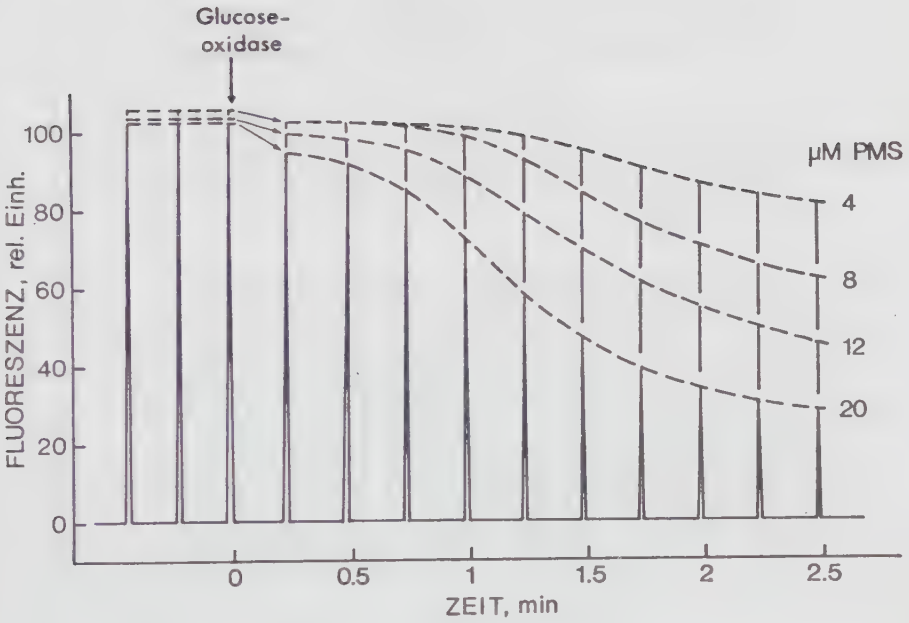


Abb. 10: Verlauf der Fluoreszenzabnahme in Thylakoiden während der Reduktion von PMS

Thunbergküvetten enthielten zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 mM Glucose, 10 µM DCMU, 5 mM $MgCl_2$, 4; 8; 12; 20 µM PMS und Chloroplasten (8 µg Chl/ml). Zum Zeitpunkt "0" wurde Glucoseoxidase vom Seitenarm in den Küvettenraum überführt. Die Endkonzentration war ca. 1 Einh./ml. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das jeweilige Fluoreszenzniveau innerhalb von Zeitperioden von 250 msec beobachtet. Anregungslicht wie in Abb. 5. Vier Schreiberkurven, den PMS-Konzentrationen entsprechend sind überlagert dargestellt.

die zu kurz sind, um einen signifikanten licht-induzierten Quench zu bewirken, die jedoch lang genug sind, um zu einem gewünschten Zeitpunkt die Höhe der Emission zu beobachten (siehe Methoden).

Wurde PMS mit Ascorbat reduziert (z. B. 5 mM), so waren die Charakteristika des Reduktionsverlaufs und der Emissionsabnahme ebenfalls analog (nicht gezeigt).

Da in einem engbandigen Bereich des Maximums der Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen wird, wäre denkbar, daß eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu einer Abnahme der Emission im Meßbereich führt. Eine derartige Ursache des Quenches ist jedoch auszuschließen. Wie Abb. 11 zeigt, bleiben die spektralen Charakteristika der Emission nach Reduktion von PMS erhalten. Lediglich die Höhe der Emission wird durch reduziertes PMS herabgesetzt.

3.3.3. Die Fluoreszenzabnahme als Funktion der Konzentration an reduziertem PMS

Die Menge an Glucoseoxidase, die dem PMS-haltigen Reaktionsansatz zugegeben wird, ist so bemessen, daß in etwa 5 Minuten das gesamte PMS reduziert vorliegt. Dies gilt auch für die Zugabe von 5 mM Ascorbat anstelle des Enzyms. Nach dieser Zeit der Inkubation im Dunkeln wurde die Emission im kontinuierlichen Licht gemessen. Innerhalb der

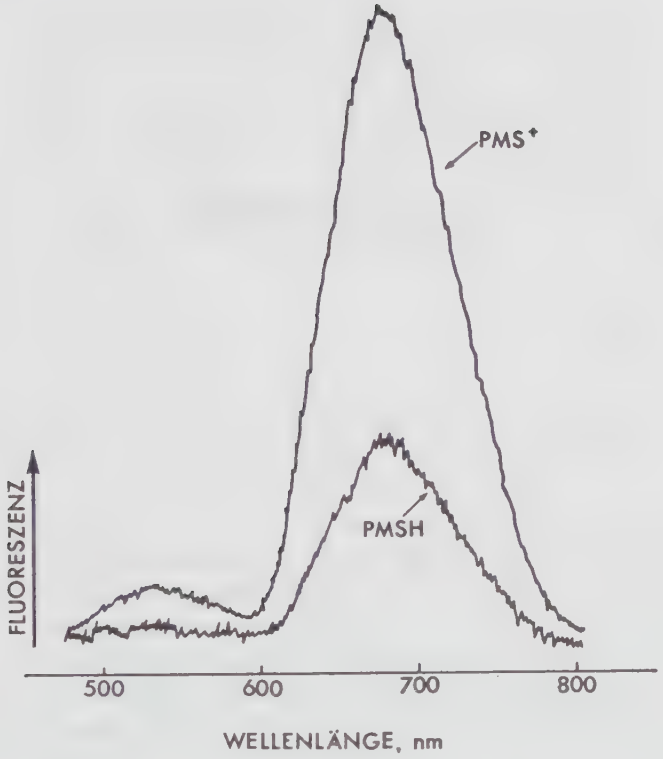


Abb. 11: Fluoreszenzemissionsspektren von Thylakoiden bei Gegenwart von oxidiertem und reduziertem PMS

Thunbergküvetten enthielten zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 mM Glucose, 10 µM DCMU, 5 mM $MgCl_2$, 20 µM PMS und Chloroplasten (13 µg Chl/ml). Zur Reduktion von PMS wurde Ascorbat zugesetzt, Endkonzentration 6 mM Dunkelinkubation 5 min. Die Messung erfolgte in einem Shimadzu Spektrophotometer MPS-50L. Zur Anregung der Fluoreszenz diente Licht mit Maximum bei 430 nm.

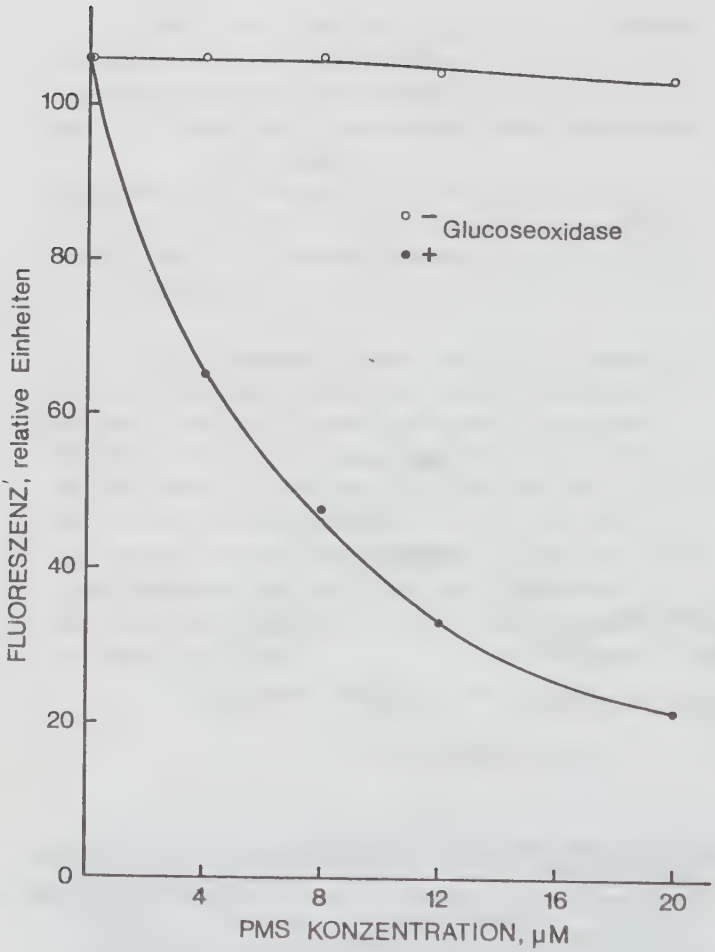


Abb. 12: Die Höhe der Fluoreszenz in Thylakoiden in Abhängigkeit von der Konzentration an reduziertem und oxidiertem PMS.

Thunbergküvetten enthielten zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 mM Glucose, 10 µM DCMU, 5 mM $MgCl_2$, Chloroplasten (8 µg Chl/ml) und PMS in den angegebenen Konzentrationen. Wo angegeben war Glucoseoxidase ca. 1 Einh./ml anwesend. Die Meßpunkte geben die Höhe der Emission nach einer Dunkelinkubation von 5 min an. Anregungslicht wie in Abb. 5.

Belichtungszeit von 16 Sekunden ist die Emission konstant und zeigt eine Abhängigkeit gegenüber der Konzentration an reduziertem PMS, wie sie in Abb. 12 dargestellt ist. Abb. 12 zeigt ebenfalls, daß die entsprechende Menge an oxidiertem PMS erst bei höheren Konzentrationen eine Abnahme der Fluoreszenz bewirkt. Ein derartiger Effekt wurde von PAPAGEORGIOU (1975) beschrieben.

3.3.4. Der Einfluß von Mg^{2+} auf den durch reduziertes PMS bewirkten Fluoreszenz-Quench

Wie schon unter 3.2. beschrieben wurde, wird die Fluoreszenzausbeute durch zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} deutlich erhöht. Abb. 13 zeigt, daß bei Anwesenheit von Mg-Ionen der Quench der Emission durch reduziertes PMS größer ist als bei Abwesenheit von Mg^{2+}. Bei der höchsten Konzentration an reduziertem PMS (40 µM) bewirkt schließlich Mg^{2+} nur noch eine geringfügige Erhöhung der Emission. Wie schon seit längerer Zeit bekannt ist (HOMANN, 1969; MURATA, 1969), ist die Erhöhung der Fluoreszenzausbeute durch Mg^{2+} vor allem auf eine Zunahme der variablen Fluoreszenz zurückzuführen. Aus dem Ergebnis der Abb. 13 läßt sich also die Vermutung ableiten, daß reduziertes PMS in höherem Maße die variable Fluoreszenz quencht.

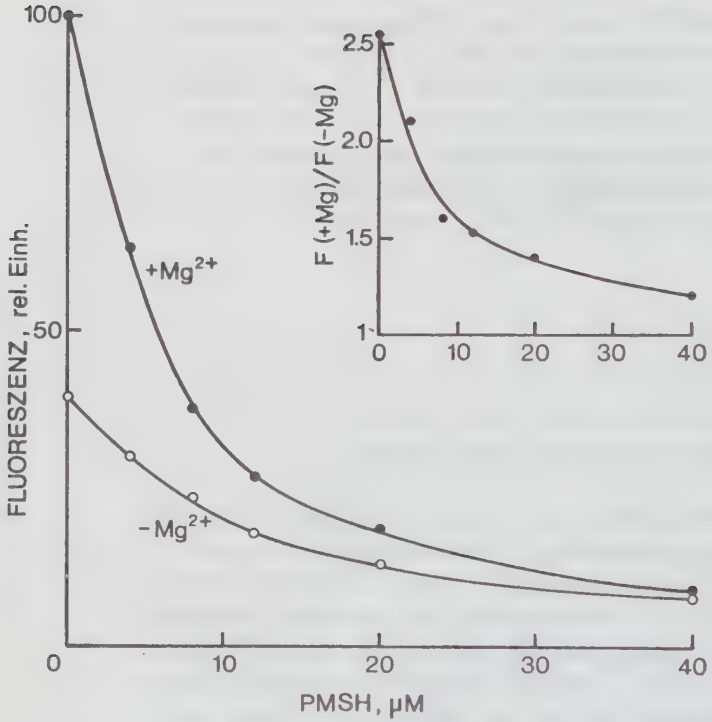


Abb. 13: Der Einfluß von $MgCl_2$ auf die Fluoreszenz-Löschung durch PMSH

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 12. Wo angegeben fehlte $MgCl_2$ im Ansatz. Die eingeschobene Abb. zeigt den Quotienten aus den jeweiligen Emissionsniveaus bei Anwesenheit und Abwesenheit von $MgCl_2$.

3.3.5. Der Einfluß von reduziertem PMS auf die variable Fluoreszenz

Unter geeigneten Lichtbedingungen und bei genügend schneller zeitlicher Auflösung läßt sich eine charakteristische Induktion der Fluoreszenz beobachten (siehe 3.1.). In Abb. 14 sind Fluoreszenzinduktionskurven bei verschiedenen Konzentrationen an reduziertem PMS dargestellt. Dabei ist jede Kurve mit einer neuen Probe gemessen.

Eine Analyse dieser Induktionskurven ist in Abb. 14b gezeigt, wobei F_o und $F_\infty - F_o$ normalisiert und als Funktion der Konzentration an reduziertem PMS aufgetragen sind. Hierbei kommt zum Ausdruck, daß durch reduziertes PMS beide Phasen gequencht werden, mit einem deutlicheren Effekt jedoch bezüglich der variablen Emission. Die Relation F_o/F_∞ nimmt also mit zunehmender Konzentration an reduziertem PMS ab.

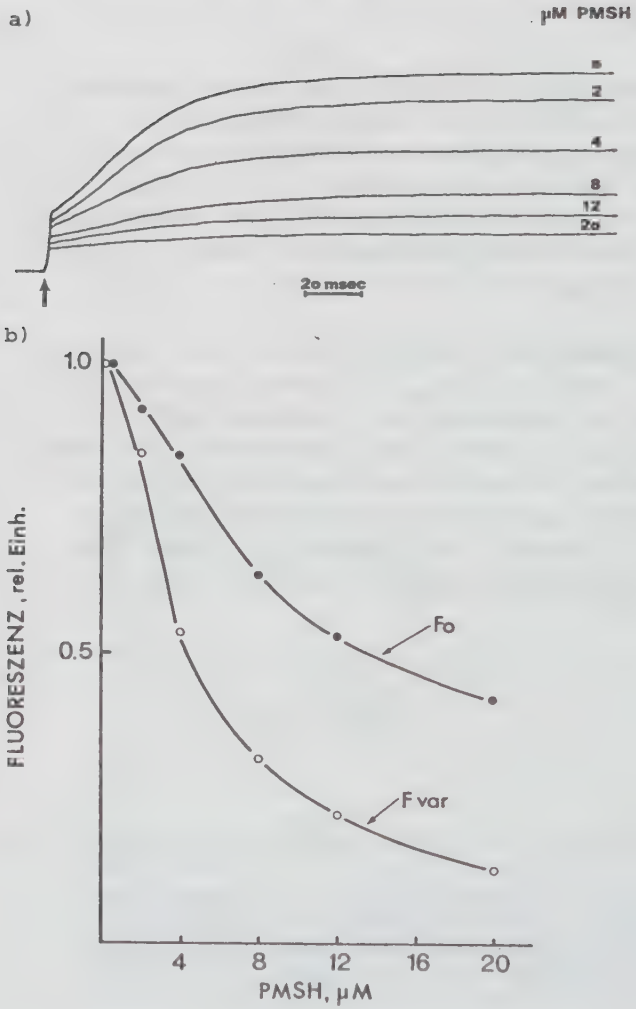


Abb. 14: Der Einfluß von reduziertem PMS auf den Induktionsverlauf der Fluoreszenz in Thylakoiden

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 12.
a) Induktionskurven bei Anwesenheit von reduziertem PMS in den angegebenen Konzentrationen.
b) Mormalisierte Niveaus von F_o und Fvar in Abhängigkeit von der Konzentration an PMSH.

3.4. Lichtabhängiger Quench der Fluoreszenz bei Gegenwart von PMS und DCMU (SCHMIDT und RURAINSKI, 1976)

3.4.1. Bestehende Beobachtungen und Interpretationen

Wie ursprünglich von MURATA und SUGAHARA gezeigt wurde, ist bei Chloroplasten bei Gegenwart von PMS und DCMU nach einsetzender Belichtung ein Quench der Chlorophyll-Fluoreszenz zu beobachten. Diese Abnahme der Emission ist hemmbar durch Entkoppler wie CCCP, Atebrin und Methylamin (MURATA et al., 1969).

Die Tatsache, daß PMS ein sehr effektiver Katalysator der Photophosphorylierung sein kann, sowie die Sensitivität des Quenches gegenüber den genannten Entkopplern ließ die Autoren einen Hoch-Energie-Zustand, der Bezug zur Photophosphorylierungs hat, als Ursache des Quenches vermuten. Die Beobachtung des PMS induzierten Quenches wurde von anderen Autoren weiter untersucht und ähnlich interpretiert (MOHANTY et al., 1973; PAPAGEORGIOU, 1975).

PAPAGEORGIOU beschreibt zusätzlich einen Quench der Emission durch oxidiertes und reduziertes PMS, der einer Stern-Volmer-Relation gehorcht. Diese Art des Quenches ist nach Auffassung des Autors einem "Hoch-Energie-Quench" überlagert. Wenn anstelle von PMS DAD unter sonst gleichen Bedingungen verwendet wird, so ist ebenfalls ein lichtinduzierter Quench, der gegenüber Entkopplern empfindlich ist, zu beobachten (WRAIGHT und CROFTS, 1970). Die hier dargestellten Ergebnisse werden zeigen, daß die Quench-Phänomene im PMS- und im DAD-System wesentliche Unterschiede aufweisen.

Wenn der Protonengradient jenen Hoch-Energie-Zustand ausdrückt, der zur Phosphorylierung führt (JAGENDORF und URIBE, 1966) und den Fluoreszenz-Quench bewirkt, so lassen Ergebnisse von MOHANTY et al. (1973) Zweifel an der Interpretation des Quenches aufkommen. Diese Autoren fanden in Glutaraldehyd-fixierten Chloroplasten, daß der Quench vollständig gehemmt ist, wohingegen der Protonengradient noch teilweise intakt ist.

Vor allem stehen jedoch der Hypothese des "Hoch-Energie-Quenches" im PMS-System Ergebnisse von SLOVACEK und BANNISTER (1976) entgegen, die keine konsistente Korrelation zwischen dem licht-induzierten Protonengradienten und dem Fluoreszenz-Quench, getestet an einer Reihe von Parametern, gefunden haben. Im Gegensatz dazu besteht im DAD-System eine derartige Korrelation (COHEN und SHERMAN, 1971).

Auch die in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse lassen bezweifeln, daß ein mit der Phosphorylierung verbundener Hoch-Energie-Zustand der Membranen die Ursache des Fluoreszenz-Quenches im PMS-System ist. Statt dessen wird eine andere Ursache diskutiert und experimentell unterstützt.

3.4.2. Die experimentellen Bedingungen, unter denen der lichtinduzierte Fluoreszenz-Quench abläuft

Wie von verschiedenen Autoren gezeigt wurde, sind ganz spezielle Bedingungen zu beachten, um eine PMS-katalysierte Photophosphorylierung zu erhalten. (JAGENDORF und MARGULIES, 1960; HAUSKA et al., 1969). Insbesondere sind die Qualität des Anregungslichtes sowie die Anwesenheit von Hemmstoffen des Elektronentransportes, von PMS-reduzierenden Agentien und von Sauerstoff entscheidende Parameter.

Die Eigenschaft von PMS als Katalysator der Phosphorylierung zu wirken, scheint davon abzuhängen, ob im Phosphorylierungsansatz die reduzierte Form des Kofaktors vorhanden ist (HAUSKA et al., 1969). Da hohe Ascorbatkonzentrationen, die PMS weitgehend reduziert halten, die Phosphorylierung hemmen (JAGENDORF et al., 1960), ist wahrscheinlich eine gewisse Relation von oxidiertem und reduziertem PMS für eine optimale Photophosphorylierung nötig. Die Reduktion von PMS kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden:

1) Bei Abwesenheit von DCMU kann PMS durch den PS II-Elektronentransport reduziert werden.

2) Bei Anwesenheit von DCMU kann stattdessen
   a) ein zugegebener Reduktant (z. B. Ascorbat) PMS reduzieren oder
   b) PMS kann in einer photochemischen Reaktion in weißem Licht reduziert werden.

Die Photophosphorylierung bei PS I-Partikeln unter Verwendung des PMS-Systems ist auch bei Abwesenheit von DCMU klein. Erst wenn PMS durch Ascorbat-Zugabe reduziert wird, werden hohe

Raten erzielt (HAUSKA et al., 1969). Dieses Ergebnis ist also konsistent mit dem genannten Prinzip.

Es wurde jedoch auch gezeigt, daß die Phosphorylierung mit rotem Anregungslicht unter strikt anaeroben Bedingungen bei hohen CMU-Konzentrationen nur wenig gehemmt ist (JAGENDORF und MARGULIES, 1960). Da unter diesen Reaktionsbedingungen keine Reduktion von PMS eintreten sollte, widerspricht dieses Ergebnis der oben aufgezeigten Hypothese.

Wie schon erwähnt, wird der Quench der Fluoreszenz durch einen mit der Phosphorylierung korrelierenden Hoch-Energie-Zustand der Membranen begründet. Ad hoc sollte also anzunehmen sein, daß nur unter Bedingungen, die eine Phosphorylierung ermöglichen, ein Quench stattfindet. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie Abb. 15 zeigt. Der lichtinduzierte Quench der Fluoreszenz ist gemessen

- mit Anregungslicht, welches nicht von PMS absorbiert wird,
- bei hohen DCMU-Konzentrationen,
- bei Abwesenheit von Reduktionsmitteln für PMS und
- unter aeroben Bedingungen.

Unter diesen Bedingungen findet bei Chloroplasten keine oder nur eine sehr geringe Photophosphorylierung statt, wie Tab. I zeigt.

Wie Abb. 15 ebenfalls zeigt, stimuliert Mg^{2+} den Quench. Unter den Standardmeßbedingungen war die Höhe des Fluoreszenz-Quenches 20 - 30 % bei Abwesenheit und 40 - 50 % bei Anwesenheit von 5 mM $MgCl_2$.

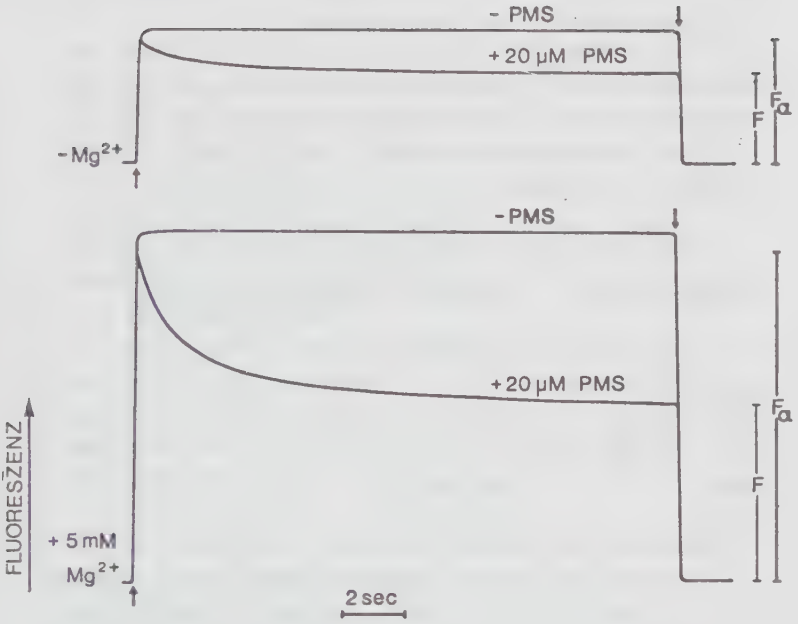


Abb. 15: Lichtinduzierter Fluoreszenz-Quench bei Gegenwart von PMS

Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 µM DCMU, Chloroplasten (8 µg Chl/ml) und wo angegeben 5 mM $MgCl_2$ und 20 µM PMS. Anregungslicht: Maximum bei 595 nm, 3,4 x 10^4 erg/cm^2sec.

TAB. I:

PHOTOPHOSPHORYLIERUNG IM PMS-SYSTEM

Reaktionsansatz, Durchführung der Messung und Bestimmung von $AT^{32}P$ wie unter 'Methoden' beschrieben. Chloroplasten $\hat{=}$ 18,3 /ug Chl/ml, aerobe Bedingungen.

Anregungslicht	zugesetzt	Phosphorylierung /umole/mg Chl hr
weiß	-	544
rot > 610 nm	-	0
weiß	4 mM NH_4Cl	2
weiß	40 /uM CCCP	0

3.4.3. Der Einfluß von Entkopplern auf den Fluoreszenz-Quench

Das wesentliche Argument, den Fluoreszenz-Quench im PMS-System mit einem Hoch-Energie-Zustand zu erklären, war die Sensitivität gegenüber Entkopplern (MURATA et al., 1969). Diese Autoren zeigen jedoch auch, daß Methylamin den Fluoreszenz-Quench vollständig erst in Konzentrationen hemmt, die bei weitem oberhalb des Bereiches liegt, in dem die Phosphorylierung entkoppelt wird.

Aus diesem Grunde wurden nochmals verschiedene Entkopplertypen in ihrer Wirkung auf den Quench getestet, nämlich der Aminentkoppler NH_4Cl, das ionophore Antibiotikum Gramicidin D und das Phenylhydrazon CCCP.

In Abb. 16 ist die Höhe des Quenches in Abhängigkeit der jeweiligen Entkopplerkonzentration gezeigt. Dabei zeigt sich, daß Gramicidin und NH_4Cl in Konzentrationen, welche die Phosphorylierung entkoppeln, keinen signifikanten Effekt hinsichtlich des Fluoreszenz-Quenches besitzen. Die Wirkung von CCCP stimmt mit den von MURATA et al. (1969) beschriebenen Befunden überein, steht jedoch im Widerspruch zu SLOVACEK et al. (1976), die nur eine sehr geringe Erhöhung der Steady-State-Fluoreszenz bei hohen FCCP-Konzentrationen finden. Diese Diskrepanz kann auf den etwas unterschiedlichen Reaktionsbedingungen beruhen; bei SLOVACEK et al. (1976) enthält der Reaktionsansatz neben 10 µM PMS 50 µM Ascorbat. Eine andere Ursache ist möglicherweise in den verwendeten Lichtintensitäten zu suchen.

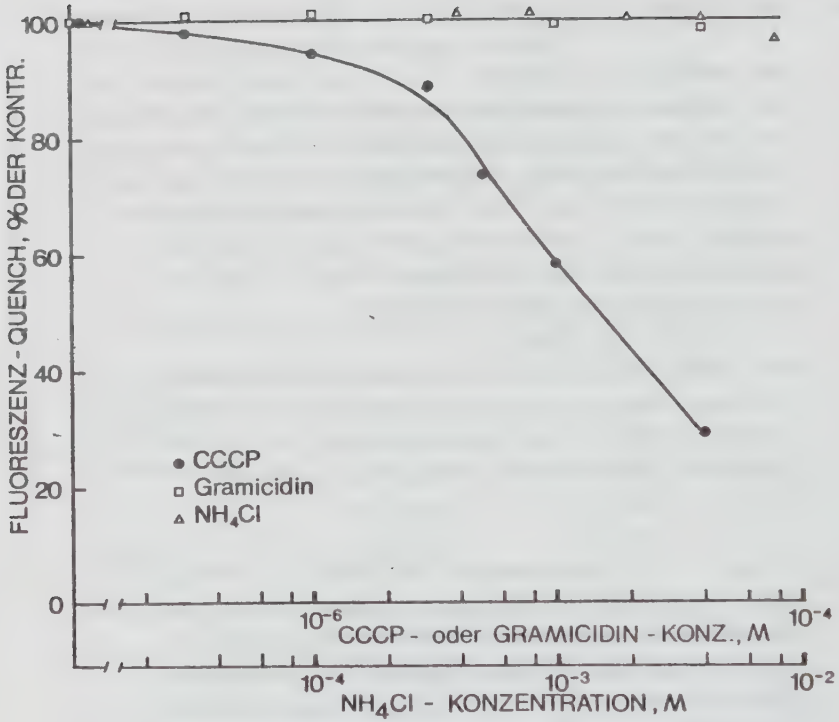


Abb. 16: Der Einfluß von entkopplern auf den lichtinduzierten Fluoreszenz-Quench bei Gegenwart von PMS

Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 /uM DCMU, 5 mM $MgCl_2$, 20 /uM PMS Chloroplasten (8 /ug Chl/ml) und die Entkoppler CCCP, Gramicidin und NH_4Cl in den angegebenen Konzentrationen. Anregungslicht wie in Abb. 15. Der relative Wert 100 entspricht einem Quench der Emission von 42%.

Wie Tab. II zeigt, ist der Hemmeffekt von 10^{-5} M CCCP bei hohen Lichtintensitäten erheblich kleiner als bei niedrigen. Eine Erklärung dafür wird in den folgenden Kapiteln gegeben.

Zusammenfassend ist festzustellen: der Effekt der Entkoppler, insbesondere der fehlende Einfluß von Gramicidin und NH_4Cl auf den Fluoreszenz-Quench, ist nicht vereinbar mit der Hypothese des "Hoch-Energie-Quenches".

TAB. II:

DER EINFLUß DER LICHTINTENSITÄT AUF DIE HEMMUNG DES FLUORESZENZ-QUENCH DURCH CCCP

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Die Lichtintensität (Balzers K-5 Filter) von 1 entspricht ca. 6 x 10^5 erg/cm^{2}sec.

Licht-intensität	zugesetzt	Fluoreszenz-Quench [%]	Hemmung [%]
1	-	65,6	-
1	10 /uM CCCP	62,2	5,2 (70)*
0,01	-	24,7	-
0,01	10 /uM CCCP	13,5	45,3 (52)

*) Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Hemmung des lichtinduzierten PMS-Transienten unter gleichen Bedingungen und sind unter 3.7. besprochen.

3.5. Lichtinduzierte transiente Absorptionsabnahme im PMS-System im Bereich der PMS-Absorption

Unter denselben Bedingungen, unter denen der lichtinduzierte Quench der Fluoreszenz zu beobachten ist, findet im PMS-System im Bereich von 370 - 400 nm eine transiente, lichtinduzierte Transmissionsänderung statt, die in anderen Reaktionssystemen nicht zu finden ist. Da sich eine gewisse Übereinstimmung im Reaktionsverhalten der Absorptionsänderung und des Fluoreszenz-Quenches herausstellte, wurde der Transient genauer untersucht und mit dem Quench anhand mehrerer Parameter verglichen.

3.5.1. Die spektralen Eigenschaften des Transienten und der Einfluß von $MgCl_2$

Wie Abb. 17 a zeigt, handelt es sich bei der transienten Absorptionsabnahme um ein relativ langsames Phänomen mit Halbzeiten für die "Licht an"- und "Licht aus"-Kinetik im Bereich von einigen Sekunden. Das Spektrum des Transienten korreliert im Bereich von 370 - 400 nm weitgehend mit dem Differenzspektrum von oxidiertem und reduziertem PMS (Abb. 17 b).

Abb. 17 a zeigt auch, daß Mg^{2+}-Ionen die Amplitude des Transienten erhöhen. Die Sättigungskonzentration für Mg^{2+} liegt bei 5 - 10 mM. Der Grad der Stimulierung ist jedoch abhängig von der Lichtintensität.

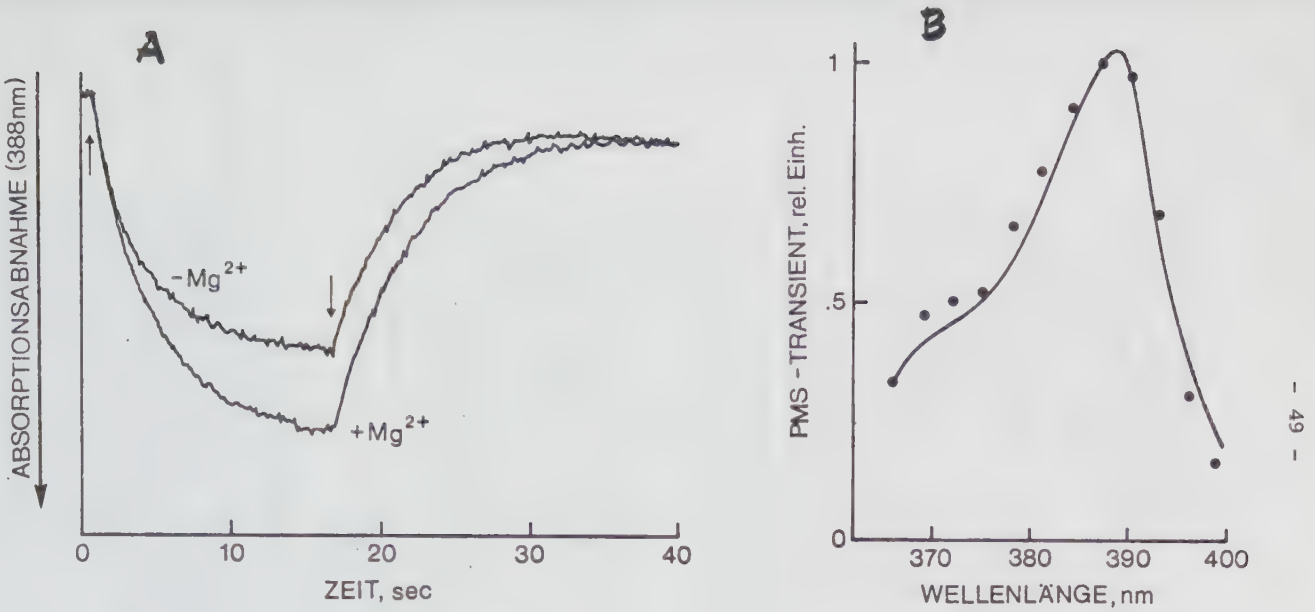


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf und spektrale Eigenschaften der lichtinduzierten transienten Absorptionsabnahme zwischen 370 und 400 nm

Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 µM DCMU, 5 mM $MgCl_2$, 20 µM PMS, Chloroplasten (8 µg Chl/ml). Wo angegeben fehlte dem Reaktionsansatz $MgCl_2$.

A) Zeitlicher Verlauf des Transienten bei 388 nm.

B) Spektrum des Transienten. Die Punkte zeigen die Amplituden der Transienten bei den angegebenen Wellenlängen. Die durchgezogene Linie ist ein Differenzspektrum von oxidiertem und reduziertem PMS. Anregungslicht wie in Abb. 15.

Während bei einer relativ niedrigen Intensität, wie sie in Abb. 17 a verwendet wurde, die Stimulierung gering ist, ist mit zunehmender Lichtintensität die Stimulierung größer.

Bei hohen Intensitäten ist jedoch der Verlauf der Absorptionsänderung bei Abwesenheit von Mg^{2+}-Ionen komplex (Abb. 18 a). Bei Anwesenheit von 5 mM $MgCl_2$ ist ein derartiger Verlauf des Transienten bei hohen Intensitäten innerhalb der Meßzeit nicht zu beobachten. Abb. 18 b zeigt den Einfluß von Mg^{2+} auf den Transienten in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Der komplexe Verlauf des Transienten bei Abwesenheit von Mg^{2+} ist berücksichtigt, indem die Maximalamplitude und die Steady-State-Amplitude dargestellt sind.

Das Ergebnis läßt spontan eine lichtabhängige, von Chloroplasten katalysierte transiente Reduktion von PMS vermuten. Da gezeigt wurde, daß reduziertes PMS die Fluoreszenz sehr effektiv quencht (SCHMIDT, 1975), würde ein solches Ergebnis eine plausible Erklärung für den lichtinduzierten Fluoreszenz-Quench darstellen. Einer derartigen Interpretation des Transienten widersprechen jedoch folgende Uberlegungen und experimentelle Hinweise:

a) Im kürzerwelligen Bereich mit Maximum bei 330 nm weist das Differenzspektrum von PMS^+ und PMSH eine zur 388 nm Bande entgegengesetzte Bande auf (s. Abb. 8). Der lichtinduzierte Transient zeigt eine derartige entgegengesetzte Ausrichtung nicht.

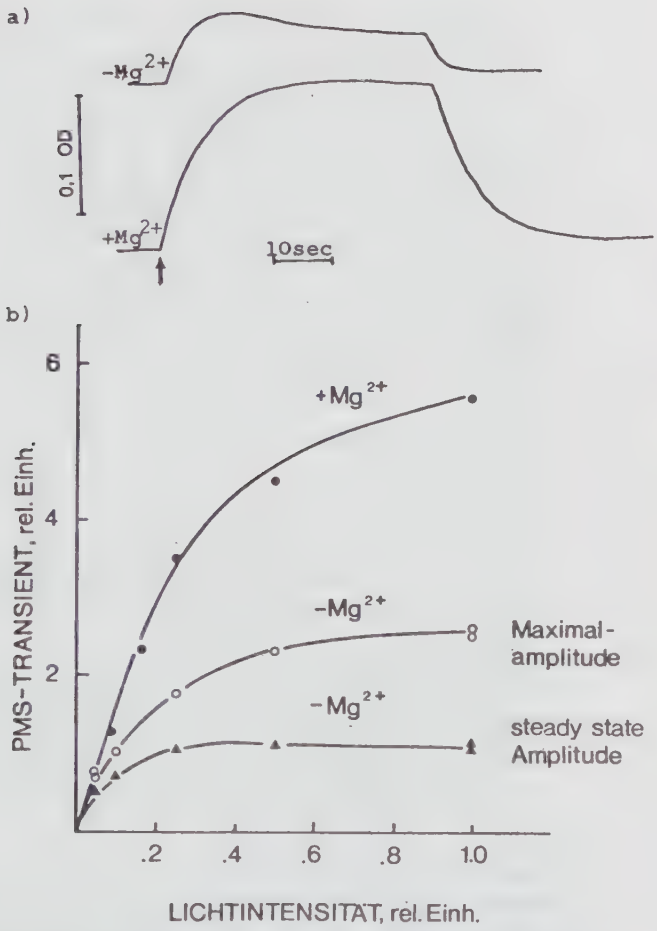


Abb. 18: Der Einfluß der Lichtintensität auf den PMS-Transienten bei Gegenwart und Abwesenheit von Mg^{2+}

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Wo angegeben fehlt im Ansatz $MgCl_2$.
Anregungslicht: 570 - 630 nm (Balzers K 5 Filter), 2×10^5 erg/cm^{2}sec entspricht einer relativen Intensität von 1.
a) Zeitlicher Verlauf des Transienten bei 388 nm, relative Intensität = 1.
b) Lichtintensitätskurven des Transienten. Die Meßpunkte entsprechen den relativen Amplituden.

b) Eine Reduktion zum semireduzierten PMS-SQ müßte einen anderen Verlauf des Spektrums im dargestellten Bereich ergeben. Außerdem wäre mit einem Maximum bei 450 nm eine entgegengesetzte Absorptionänderung, die nicht beobachtet wurde, zu erwarten(ZAUGG, 1964).

c) Aus Lichtintensitätskurven wurden Absorptionsänderungen für unendlich hohe Intensitäten extrapoliert, die - in PMS-Konzentrationen umgerechnet - einem Verhältnis von 0.5 µmole PMS/µmol Chlorophyll entsprechen. In einigen Experimenten lag der Wert noch deutlich höher.

   Wenn die Absorptionsänderung eine Reduktion von PMS reflektierte, so müßte eine entsprechende Menge an Reduktionsequivalenten vorhanden sein. Ein derartig großer Pool an Reduktionsequivalenten ist jedoch mit den bestehenden Konzepten des photosynthetischen Elektronentransports nicht vereinbar.

d) Eine andere Möglichkeit, daß unter Umgehung des DCMU-Blocks H_2O als Donor fungiert, kann weitgehend ausgeschlossen werden, da unter den Meßbedingungen keine entsprechende O_2-Entwicklung gemessen wurde.

Da also erhebliche Zweifel bestehen, daß eine direkte Reduktion von PMS die beobachtete Absorptionsabnahme mit den spektralen Charakteristika von PMS bewirkt hat, wurde nach anderen Erklärungsmöglichkeiten gesucht.

3.5.2. Bindung von PMS an die Thylakoidmembranen

In einer Reihe von Arbeiten wurde gezeigt, daß organische Moleküle beim Binden an Mitochondrien (DELL'ANTONE et al., 1972) und an Chloroplasten (HEATH, 1973) ihre Absorptionseigenschaften verändern. Für PMS wurde auch gezeigt, daß seine Absorption beim Binden an native DNA beträchtlich abnimmt, und ein geringer bathochromer Shift des Absorptionsmaximums stattfindet (ISHIZU et al., 1969). Im weiteren wurde deshalb versucht festzustellen, ob eventuell eine lichtinduzierte Bindung von PMS an Thylakoidmembranen unter den bisher verwendeten Bedingungen stattfindet.

Bei der Zentrifugationsmethode, die hierfür angewandt wurde, wird der Reaktionsansatz belichtet, im Licht abzentrifugiert und im Überstand die Extinktion bei 388 nm gemessen. Wenn PMS gebunden wird, sollte der gebundene Anteil im Licht zusammen mit den Chloroplasten abzentrifugiert werden. Im Überstand würde dieser Anteil bei belichteten Reaktionsansätzen fehlen im Gegensatz zu unbelichteten.

Wie Tab. III zeigt, wird tatsächlich PMS in einer lichtinduzierten Reaktion an die Thylakoide gebunden. Außerdem ergeben sich folgende Hinweise, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem Transienten und dem Binden von PMS vermuten lassen.

- Die Menge an PMS, die einerseits gebunden, andererseits durch den Transienten repräsentiert wird, stimmt gut überein.

TAB. III:

LICHTABHÄNGIGE BINDUNG VON PMS AN DIE THYLAKOIDE

Reaktionsansatz wie in Abb. 17. Durchführung der Messung wie unter 'Methoden' beschrieben.
Chloroplasten ≙ 23,4 /ug Chl/ml.
Bedingungen: a) 1 min Licht, Zentrifugation im Licht
b) 1 min Licht, 1 min Dunkel, Zentrifugation im Dunkeln.

Zugesetzt	Bedingung	PMS-Bindung* /umole/mg Chl
-	a	0,49
minus $MgCl_2$	a	0,26
-	b	0,06
3 /uM CCCP	a	0,23
40 /uM CCCP	a	0,05
40 /uM Gramicidin	a	0,46
4 mM NH_4Cl	a	0,41

*) ε_{388} für PMS: 23,8 $mM^{-1}cm^{-1}$

- Beide Phänomene, das Binden von PMS und der Transient, werden durch Mg^{2+}-Ionen stimuliert.
- In einer der Belichtung folgenden Dunkelzeit wird die Absorptionsabnahme rückgängig gemacht, und PMS wird von den Thylakoiden wieder entlassen.

Der letzte Effekt wurde dadurch untersucht, daß zwischen Belichtung und Abzentrifugieren ein Dunkelintervall eingeschaltet wurde (Tab. III).

Eine lichtinduzierte Bindung von PMS an Chloroplasten wurde von LYNN (1967) schon beschrieben. Im Vergleich der Ergebnisse zeigt sich zwar eine Übereinstimmung in der Menge an gebundenem PMS, jedoch zeigt der Autor, daß DCMU die Bindung nahezu vollständig hemmt. Dies ist im Widerspruch zu den hier gezeigten Ergebnissen, die alle mit DCMU-vergifteten Chloroplasten erhalten wurden.

3.6. Qualitatativer Vergleich des lichtinduzierten Fluoreszenz-Quenches und des PMS-Transienten

Anhand einer Reihe von Parametern, wie z. B. dem Einfluß von Entkopplern, des pH-Wertes oder einer Detergenzbehandlung wurde eine qualitative Übereinstimmung im Reaktionsverhalten des Quenches und des Transienten gefunden. In quantitativer Hinsicht (z. B. Kinetiken, Lichtsättigung) besteht jedoch keine proportionale Korrelation. Wie unter 3.7. gezeigt wird, läßt sich aber durch eine andere mathematische Beziehung der Zusammenhang zwischen Transienten und Quench beschreiben.

Beim qualitativen Vergleich der Phänomene läßt sich zunächst feststellen (Abb. 19): Während nach Einsetzen der Belichtung eine Bindung von PMS und eine damit verbundene Absorptionsabnahme stattfindet, wird die Fluoreszenz von einem ursprünglich hohen Niveau ausgehend (siehe dazu Abb. 15) erniedrigt. Beide Reaktionen erreichen einen steady-state und kehren nach der Belichtung in den Ausgangszustand zurück.

Die Rückkehr der Fluoreszenz wurde untersucht, indem während der Dunkelzeit nach vorangegangener Belichtung zu bestimmten Zeitpunkten kurze Lichtperioden (ca. 70 msec.) eingeschaltet wurden. Diese Lichtperioden sind zu kurz, um einen merklichen Quench zu bewirken; sie sind jedoch lang genug, um die Höhe der Fluoreszenz zu einem gewünschten Zeitpunkt zu messen.

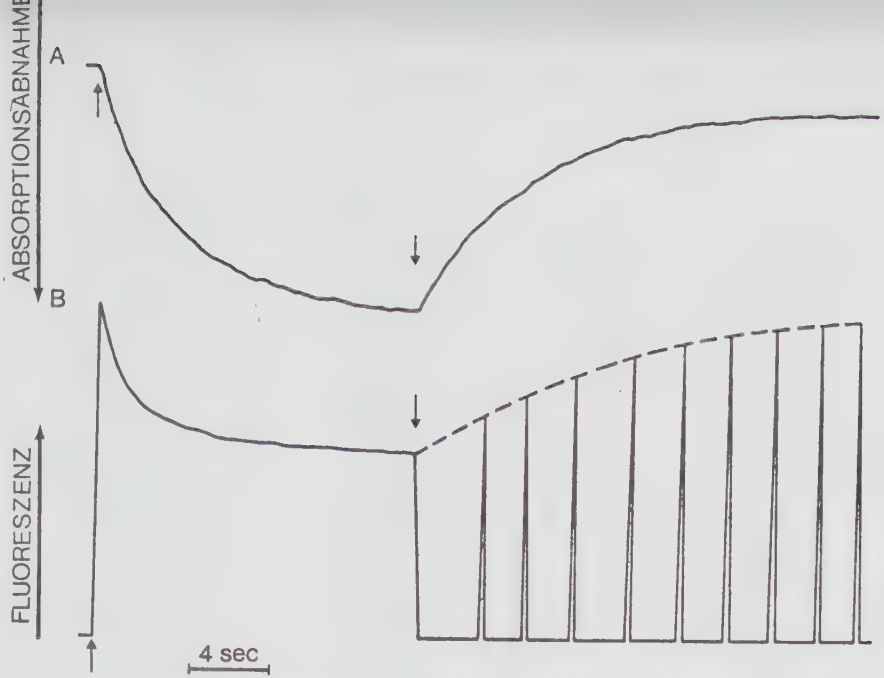


Abb. 19: Der lichtabhängige Quench der Fluoreszenz und die lichtabhängige Absorptionsabnahme bei 388 nm und deren Rückkehr im Dunkeln

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17.
A) Zeitlicher Verlauf des Transienten bei 388 nm.
B) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz-Änderung. Zur Beobachtung der Rückkehr der Emission im Dunkeln wurde sie zu den angegebenen Zeitpunkten während Lichtperioden von ca. 70 msec gemessen.

3.6.1. Der Einfluß von Entkopplern

Unter 3.4.3. wurde schon gezeigt, daß CCCP den Fluoreszenz-Quench hemmt, während NH_4Cl und Gramicidin keinen Einfluß haben. Wie Abb. 20 zeigt, ergibt sich dasselbe Ergebnis bezüglich des PMS-Transienten.

Zum Vergleich ist in Abb. 20 (gestrichelte Linie) die CCCP-Hemmkurve für den Fluoreszenz-Quench eingetragen. Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber CCCP wird im Folgenden noch gedeutet.

Zusammenfassend ist die Wirkung von Entkopplern auf den Quench, den PMS-Transienten und die Bindung von PMS an die Thylakoide in Tab. IV dargestellt. Für alle drei Phänomene ist eine qualitative Übereinstimmung zu sehen.

Insbesondere ist festzustellen, daß Methylamin in einer bei weitem entkoppelnden Konzentration den Fluoreszenz-Quench nicht hemmt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu MURATA et al. (1969).

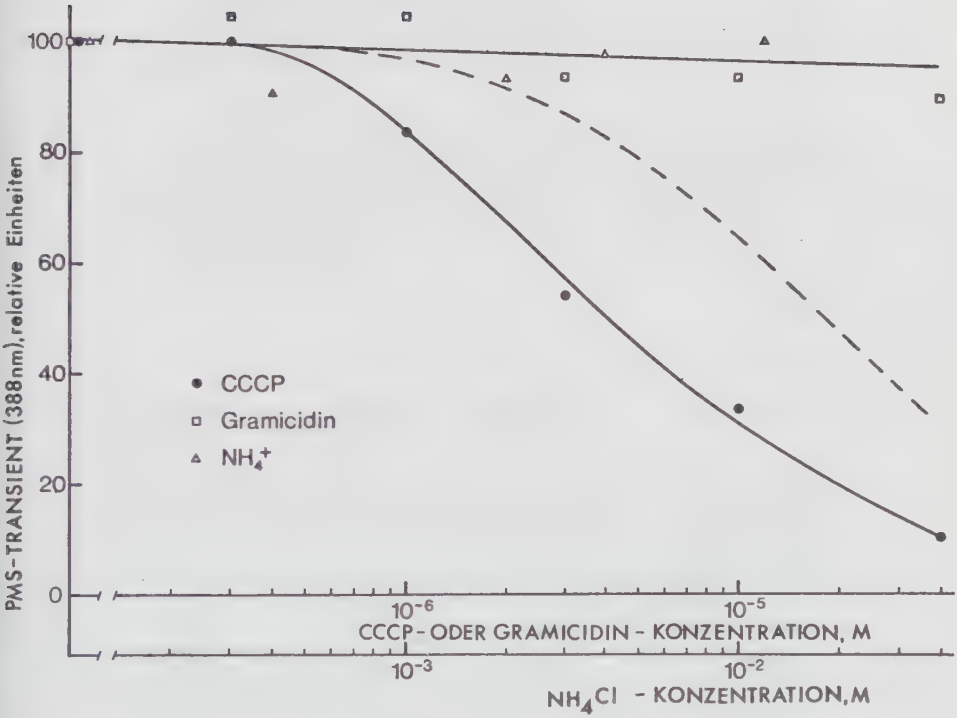


Abb. 20: Der Einfluß von Entkopplern auf den PMS-Transienten

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb 17.
Zusätzlich waren die Entkoppler CCCP, Gramicidin oder NH_4Cl in den angegebenen Konzentrationen anwesend.
Die gestrichelte Linie zeigt die CCCP-Hemmkurve für den Fluoreszenz-Quench aus Abb. 16.

TAB. IV:

DER EINFLUß VON ENTKOPPLERN AUF DEN FLUORESZENZ-QUENCH, DEN PMS-TRANSIENTEN UND DIE BINDUNG VON PMS

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Die Daten sind als % der Kontrollwerte ausgedrückt. 100% entsprechen einem Fluoreszenz-Quench von 44%, einem PMS-Transienten von 0,08 /umole PMS/mg Chl und einer Bindung von PMS von 0,49 /umole/mg Chl.

Zugesetzt	Fluoreszenz-Quench	PMS-Transient	PMS-Bindung
40 /uM CCCP	28,6	8,6	9,9
160 /uM Atebrin-analog	22,4	8,6	-
40 /uM Gramicidin	94,1	105,0	93,9
4 mM NH_4Cl	100,0	101,1	83,6
8 mM Methylamin	97,7	96,8	-

3.6.2. Der Einfluß des pH-Wertes

Der Quench und der PMS-Transient haben ein breites pH-Optimum (Abb. 21). Bei pH-Werten unterhalb 7.5 werden die Signale für beide Reaktionen kleiner. Die Abnahme ist jedoch beim Transienten deutlicher als beim Quench. Dieser Unterschied spiegelt offensichtlich wiederum die nicht-lineare Relation der beiden Phänomene wider.

3.6.3. Der Einfluß von Triton X-100

Der Quench und der Transient reagieren sehr empfindlich auf eine Detergenz-Behandlung mit Triton X-100. Auch hier zeigt sich jedoch eine höhere Sensitivität des Transienten gegenüber dem Detergenz (Abb. 22).

Da ebenfalls nach kurzen Ultraschall-Behandlungen der Chloroplasten (nicht gezeigt) beide Reaktionen sehr stark gehemmt sind, läßt sich vermuten, daß nur intakte Thylakoidmembranen eine lichtinduzierte Bindung von PMS bewirken können.

3.6.4. Der Einfluß einer Trypsinbehandlung

Die Behandlung von Thylakoiden mit dem proteolytischen Enzym bewirkt eine signifikante Hemmung sowohl des PMS-Transienten wie des Fluoreszenz-

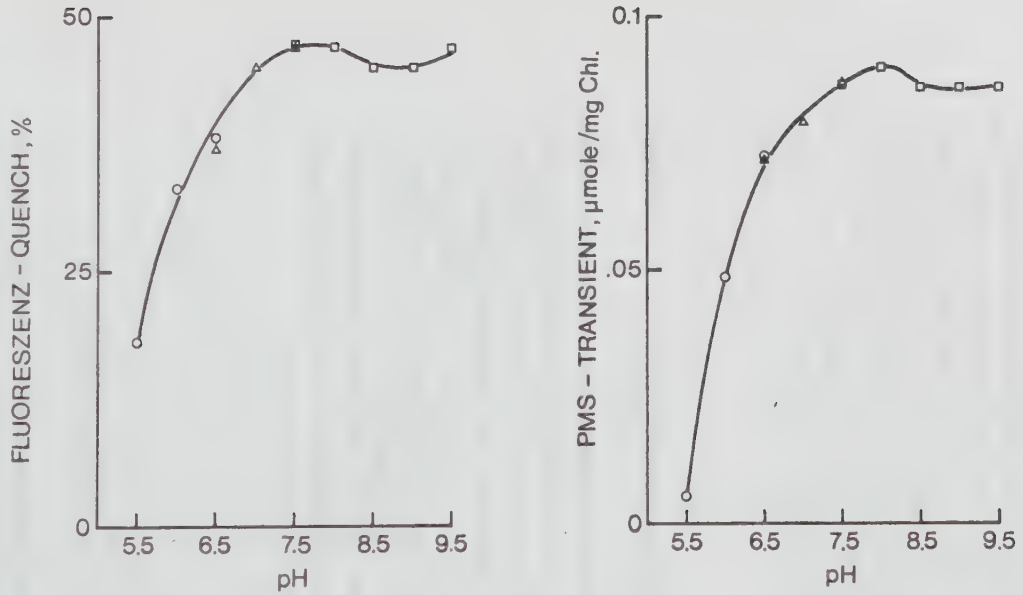


Abb. 21: Der Einfluß des pH-Wertes auf den Fluoreszenz-Quench und den PMS-Transienten bei 388 nm

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Jedoch dienten als Puffer im Medium (20 mM): o MES; Δ HEPES; □ Tricin. Die Transienten sind in PMS-Konzentrationen umgerechnet, ε_{388}=23,8 $mM^{-1}cm^{-1}$.

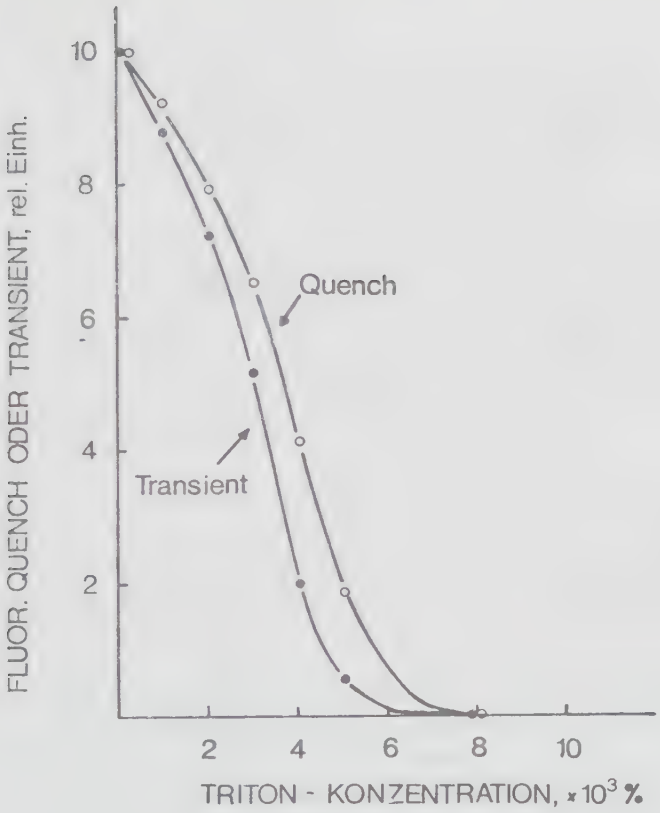


Abb. 22: Der Einfluß von Triton X-100 auf den Fluoreszenz-Quench und den PMS-Transienten bei 388 nm

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Triton X-100 - Konzentration wie angegeben.

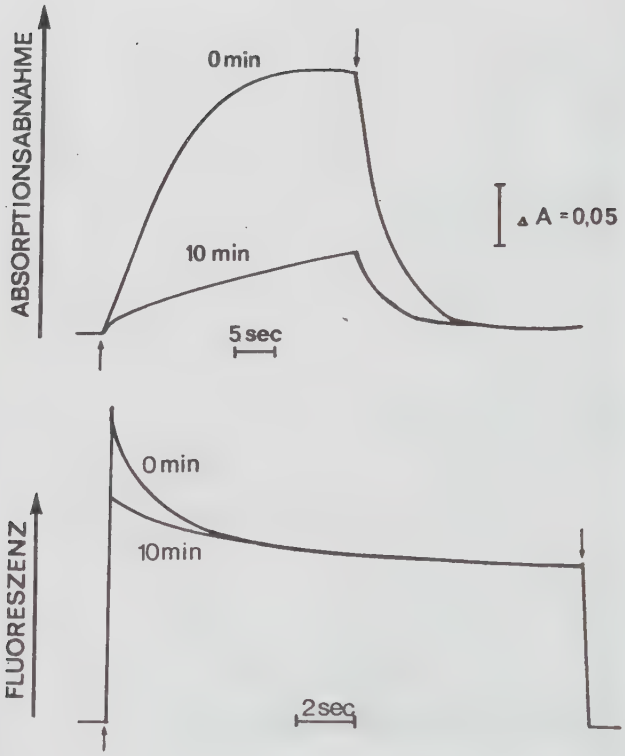


Abb. 23: Der Einfluß einer Trypsinbehandlung auf den Fluoreszenz-Quench und den PMS-Transienten bei 388 nm

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Die Präparation der trypsinbehandelten Thylakoide ist unter 'Methoden' beschrieben. Die Zeitangaben an den Kurven beziehen sich auf die Dauer der Trypsinbehandlung. Anregungslicht: 570 - 630 nm, $2 \times 10^5 erg/cm^2 sec$.

Quenches (Abb. 23). Es ist seit längerem bekannt, daß die Trypsinbehandlung bezüglich der photosynthetischen Aktivitäten von Thylakoiden sehr spezifische Hemmeffekte hat.

Neben einer Entkopplung der Photophosphorylierung (SELMAN und BANNISTER, 1971) tritt vor allem eine sehr rasche Hemmung im Bereich von Photosystem II auf (MANTAI, 1970; RENGER et al. 1976; RENGER, 1976), wobei sowohl auf der Donor- wie auf der Akzeptorseite von System II eine Hemmstelle diskutiert wird (SELMAN und BANNISTER, 1971).

Die Hemmung der Phosphorylierung im PMS-zyklischen System wird von SELMAN et al. (1973) durch bloße Entkopplung erklärt, während STROTMANN et al. (1972) auch einen gehemmten zyklischen Elektronentransport diskutieren.

Auf welchen der genannten Effekte die Hemmung der PMS-Bindung und des Fluoreszenz-Quenches möglicherweise zurückzuführen ist, kann hier nicht entschieden werden. Im Zusammenhang mit den Triton- bzw. Ultraschallexperimenten (3.6.3.) könnte eine veränderte Ultrastruktur der Thylakoidmembranen für die Trypsinhemmung verantwortlich sein. Die lamellare Struktur der Thylakoide, soweit sie sich im Elektronenmikroskop unter Verwendung der Dünnschnitt-Technik zu erkennen gibt, scheint allerdings durch die Trypsinbehandlung nicht verändert zu werden (SELMAN et al., 1973). Die zweite Möglichkeit einer Erklärung ist eine Hemmung einer der Reaktionen innerhalb des Elektronentransports, die zu einer Bindung von PMS führt.

3.7. Quantitativer Vergleich des lichtinduzierten Fluoreszenz-Quenches und des PMS-Transienten

Im qualitativen Vergleich zeigen der PMS-Transient und der Fluoreszenz-Quench bei allen getesteten Parametern jeweils ähnliche Ergebnisse. Es ist jedoch in allen Fällen festzustellen, daß die Sensitivität des Transienten gegenüber hemmenden Agentien oder Behandlungen stets größer ist als der Fluoreszenz-Quench. Eine Erklärung dafür läßt sich aus den Lichtintensitätskurven für beide Phänomene ableiten (Abb. 24 a). Dabei zeigt sich, daß der Quench bei wesentlich niedrigeren Lichtintensitäten in den Sättigungsbereich kommt als der Transient.

Unter der Annahme, daß der Transient und der Quench kausal korrelieren, ist aus den Intensitätskurven abzuleiten: im unteren Intensitätsbereich bewirkt eine Erhöhung des Transienten um einen bestimmten Betrag eine stärkere Zunahme des Quenches als es im höheren Intensitätsbereich der Fall ist.

Das nicht-proportionale Verhalten der beiden Meßgrößen, wie es sich anhand der Intensitätskurven zeigt, läßt folgende Ergebnisse erwarten:

a) Die Sensitivität des Transienten und des Quenches sollte bei sehr niedrigen Lichtintensitäten ähnlich sein. Bei hohen Intensitäten sollte der Transient sensitiver sein als der Quench. Dies ist in Tab. II gezeigt worden. Da der Einfluß von Triton, des pH-Wertes, von CCCP und der Trypsinbehandlung bei einer Lichtintensität gemessen wurde, bei der schon zu ca. 70 % der Sättigungswert des Quenches

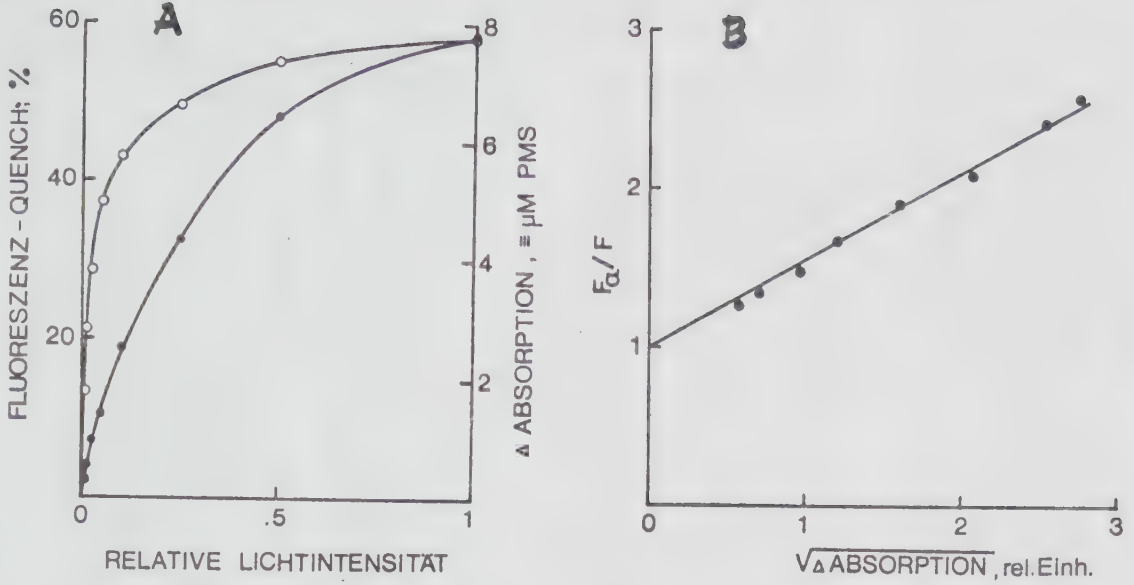


Abb. 24: Die Abhängigkeit des Fluoreszenz-Quenches und des PMS-Transienten von der Lichtintensität

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Die relative Lichtintensität 1 entspricht 2 x 10^5 erg/cm^2sec (570 - 630 nm).
A) Fluoreszenz-Quench und PMS-Transient bei 388 nm als Funktion der Lichtintensität. Die Transienten wurden in PMS-Konzentrationen umgerechnet, ε_{388} = 23,8 $mM^{-1}cm^{-1}$. B) F_a/F als Funktion von $(\Delta \text{Absorption})^{1/2}$ bei jeweils gleichen Lichtintensitäten. F_a und F sind wie in Abb. 15 verwendet.

erreicht wurde, ist stets eine höhere Sensitivität des Transienten zu beobachten.

b) nur bei niedrigen Lichtintensitäten sollten die Kinetiken des Transienten und des Quenches übereinstimmen; bei hohen Intensitäten sollte der Quench schneller als der Transient sein. Wie Tab. V zeigt, entspricht diese Forderung den experimentellen Befunden.

Es stellt sich im weiteren heraus, daß das Verhältnis, gebildet aus der Höhe der Fluoreszenz, zur Zeit 'Null' (F_a) und im steady state (F) in einer linearen Beziehung zur Quadratwurzel der Amplitude des Transienten steht (Abb. 24 b).

Unter der Annahme, daß die Höhe der Transienten der Konzentration eines Fluoreszenz-Quenchers (Q) (gebundenes PMS) proportional ist, läßt sich das Ergebnis mathematisch formulieren als

$$\frac{F_a}{F} = 1 + \alpha\,[Q]^{1/2}$$

und entspricht damit einer modifizierten Stern-Volmer-Beziehung (STERN und VOLMER, 1919)

$$\frac{F_a}{F} = 1 + \alpha\,[Q]$$

α ist eine Sammlung von Konstanten und berücksichtigt sowohl die Wahrscheinlichkeit von effektiven Kollisionen zwischen Fluoreszenz-Emittor und Quencher wie auch die Fluoreszenz-Lebensdauer und [Q] ist die Konzentration eines Quenchers.

Die Wurzelbeziehung spiegelt sich auch im Vergleich der Kinetiken des Quenches und des Transienten wider (Abb. 25). Dazu wurden die Kurven aus Abb. 18 verwendet und F_a/F zu bestimmten Zeitpunkten gegen die Quadratwurzel der Absorptionsänderung zu den jeweils selben Zeitpunkten aufgetragen. Die lag-Phase spiegelt möglicherweise eine zeitliche Verzögerung wider, mit der die quenchende Spezies von PMS an den Ort der Emission diffundiert.

Wie unter 3.3. gezeigt wurde, wird die Fluoreszenz sehr effektiv durch reduziertes PMS gequencht. In Abb. 26 wurde für diese Art des Quenches das Verhältnis F_a/F in Abhängigkeit von der Konzentration an reduziertem PMS aufgetragen. Das Ergebnis zeigt eine Stern-Volmer-Beziehung des Quenchers in Bezug zur Fluoreszenz und läßt einen mechanistischen Unterschied zum lichtinduzierten Quench vermuten.

TAB. V:

DER EINFLUß DER LICHTINTENSITAT AUF DIE HALBWERTZEIT DES FLUORESZENZ-QUENCH UND DES PMS-TRANSIENTEN

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in TAB. III.

Lichtintensität	Fluoreszenz-Quench $t_{1/2}$[sec]	PMS-Transient $t_{1/2}$[sec]
1	0,45	5,0
0,01	1,5	1,5

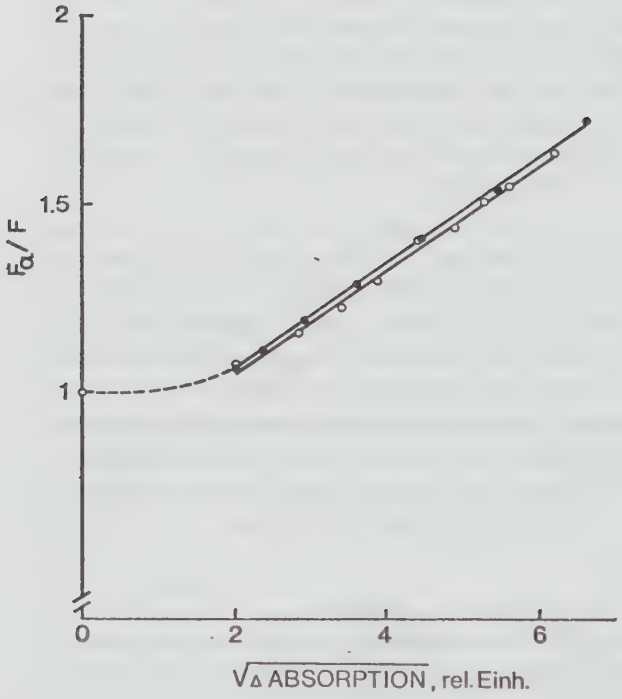


Abb. 25: Vergleich der Kinetiken des PMS-Transienten und des Fluoreszenz-Quenches

Aus Abb. 19 wurden bei jeweils gleichen Zeitpunkten im Verlauf des Quenches und des Transienten Werte für F_a/F und Absorption ermittelt; F_a/F wurde als Funktion von $(\Delta \text{ Absorption})^{1/2}$ aufgetragen.

o Lichtreaktion, • Dunkelreaktion

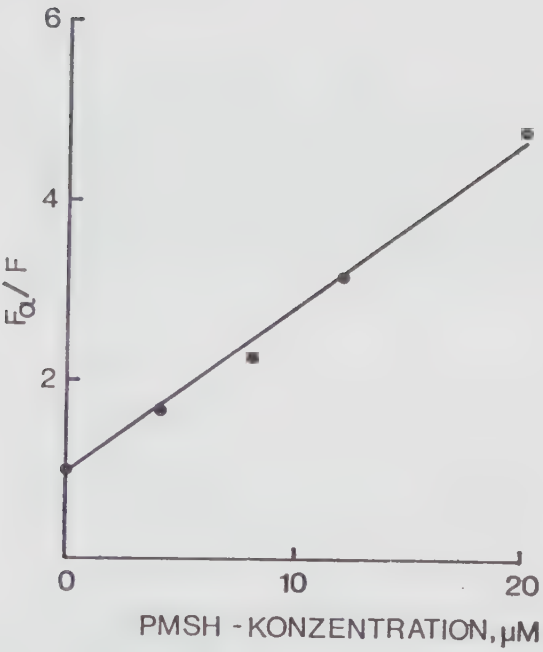


Abb. 26: Stern-Volmer-Diagramm des Quenches der Fluoreszenz durch reduziertes PMS

Die Werte für die Fluoreszenzniveaus bei Abwesenheit von PMSH (F_0) und bei den angegebenen PMSH-Konzentrationen (F) sind aus SCHMIDT (1975) Fig. 3 entnommen. F_0/F ist als Funktion der PMSH-Konzentration dargestellt.

3.8. Fluoreszenz-Quench mit anderen Kofaktoren des zyklischen Elektronentransports

Das Phenylendiaminderivat DAD und der Phenazinabkömmling Pyocyanin können einen zyklischen Photosystem I Elektronentransport katalysieren. Für TMPD ist eine Donatorfunktion für System I beschrieben (TREBST und PISTORIUS, 1965). DAD und TMPD können einen lichtinduziertenFluoreszenz-Quench bewirken.

3.8.1. Fluoreszenz-Quench mit DAD als Kofaktor

Von DAD ist bekannt, daß es einen lichtinduzierten Quench der Chlorophyll-Fluoreszenz in Chloroplasten katalysiert, der im Zusammenhang mit dem PMS-katalysierten Quench gesehen wurde (WRAIGHT und CROFTS, 1970; COHEN und SHERMAN, 1972). Die Sensitivität des DAD-induzierten Quenches gegenüber Entkopplern und die sehr gute Korrelation zum Protonengradienten führte zu der Interpretation, daß ein Hoch-Energiezustand der Membranen, der Bezug zur Phosphorylierung hat, die Ursache des Quenches ist.

Tab. VI bestätigt die genannten Befunde: Der DAD-katalysierte Quench der Fluoreszenz wird durch die drei Entkoppler NH_4Cl, Gramicidin und CCCP weitgehend gehemmt. Das Ergebnis steht somit im deutlichen Gegensatz zum PMS-induzierten Quench, bei dem keine generelle Sensitivität gegenüber Entkopplern festzustellen war. Die Erklärung des DAD-induzierten Quenches mittels eines Hoch-Energie-Zustandes erscheint also eine akzeptable Interpretation zu sein.

TAB. VI:

LICHTINDUZIERTER FLUORESZENZ-QUENCH MIT DEM KOFAKTOR DAD

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Anstelle von PMS wurde jedoch 0,1 mM DAD eingesetzt. Der Fluoreszenz-Quench wurde 30 sec nach Beginn der Belichtung gemessen.

Zugesetzt	Fluoreszenz-Quench [%]	Hemmung [%]
-	18,0	0
40 µM CCCP	3,1	82,8
4 µM Gramicidin	0	100
4 mM NH_4Cl	1,0	94,4

TAB. VII:

LICHTINDUZIERTER FLUORESZENZ-QUENCH MIT DEM KOFAKTOR TMPD

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Anstelle von PMS wurde 0,1 mM TMPD eingesetzt. Der Fluoreszenz-Quench wurde 50 sec nach Beginn der Belichtung bestimmt.

Zugesetzt	Fluoreszenz-Quench [%]	Hemmung [%]
-	25,6	0
40 µM CCCP	7,5	70,7
4 µM Gramicidin	16,7	34,8
4 mM NH_4Cl	23,3	9,0

3.8.2. Fluoreszenz-Quench mit TMPD als Kofaktor

Wenn TMPD anstelle von DAD oder PMS verwendet wird, ist ebenfalls ein lichtinduzierter Quench der Fluoreszenz festzustellen (Tab. VII). Der Einfluß der Entkoppler ist in diesem Fall schwierig zu beurteilen. Eine Hemmung des Quenches ist mit jedem der drei Entkoppler zu beobachten, wodurch sich eine gewisse Ähnlichkeit zum DAD-induzierten Quench andeutet. Es ist jedoch festzustellen, daß die Hemmung durch Gramicidin und NH_4Cl deutlich niedriger ist als die Hemmung durch CCCP. Der besondere Effekt von CCCP wiederum läßt eine gewisse Verwandtschaft zum PMS-induzierten Quench vermuten.

3.8.3. Fluoreszenz-Quench mit Pyocyanin als Kofaktor

Mit Pyocyanin, dem hydroxylierten Derivat von PMS, ist innerhalb einer Belichtungszeit, in der im PMS-System der Quench das steady-state-Niveau erreicht, kein signifikanter lichtinduzierter Quench festzustellen. Dagegen zeigt sich ein Quench, der allein durch oxidiertes Pyocyanin hervorgerufen wird (Tab. VIII). Dieser Quench ist wahrscheinlich mit dem durch PMS^+ in höheren Konzentrationen hervorgerufenen Quench zu vergleichen.(PAPAGEORGIOU, 1975), jedoch ist Pyocyanin ein wirksamerer Quencher. Möglicherweise ist die höhere Wirksamkeit darauf zurückzuführen, daß Pyocyanin wesentlich lipophiler als PMS ist (HAUSKA, 1972), somit eine

TAB. VIII:

FLUORESZENZ-QUENCH DURCH OXIDIERTES UND REDUZIERTES PYOCYANIN

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 17. Anstelle von PMS wurde Pyocyanin in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Wo angegeben wurde eine Spatelspitze Dithionit zugegeben. Die Emission wurde nach einer Dunkelzeit von 2 min bestimmt. Innerhalb einer Belichtungszeit von 16 sec war kein lichtinduzierter Quench festzustellen. In Klammern sind die Werte der nicht-lichtinduzierten Fluoreszenz-Löschung durch die jeweils gleichen Konzentrationen an oxidiertem bzw. reduziertem PMS angegeben.

Zugesetzt	Fluoreszenz [% der Kontr.]	
-	100	
Dithionit	108	
6,6 µM Pyocyanin	89	
16,6 µM Pyocyanin	75	(< 10)
6,6 µM Pyocyanin + Dithionit	45	(45)
16,6 µM Pyocyanin + Dithionit	25	(21)

höhere Löslichkeit in der Thylakoidmembran besitzt und eine höhere lokale Konzentration am Ort der Fluoreszenz-Emission hat.

Das Redoxpotential von Pyocyanin ist zu niedrig, um es mit Ascorbat zu reduzieren, so daß Reduktionsmittel wie Dithionit oder Borhydrid verwendet werden müssen. Tab. VIII zeigt auch, daß reduziertes Pyocyanin sehr effektiv die Fluoreszenz quencht, analog zum reduzierten PMS und daß in diesem Fall das Ausmaß des Quenches dem von reduziertem PMS entspricht (Werte in Klammern).

Dieses Ergebnis unterstützt das oben besprochene Argument, daß die unterschiedliche Lipophilität zwischen PMS und Pyocyanin für das unterschiedliche Ausmaß des Quenches durch die oxidierten Kofaktoren verantwortlich ist. Denn die reduzierten Formen von PMS und Pyocyanin, die beide sehr lipophil sind (HAUSKA, 1972) haben dieselbe Wirksamkeit als Quencher der Fluoreszenz.

3.9. Der Einfluß von oxidiertem und reduziertem PMS auf die Rückreaktion von Photosystem II (SCHMIDT, 1976)

3.9.1. Die Restoration der Fluoreszenzinduktion und die Rückreaktion von PS II

Es ist seit längerem bekannt, daß der charakteristische Induktionsverlauf der Fluoreszenz in DCMU-behandelten Chloroplasten in einer Dunkelzeit von weniger als 0.5 Minuten weitgehend wiederhergestellt wird (HEBER und FRENCH, 1968; BENNOUN, 1970; HOMANN, 1971).

Nach der weithin akzeptierten Hypothese von DUYSENS und SWEERS (1963) spiegelt die Höhe der variablen Fluoreszenz den Redox-Zustand des primären Akzeptors Q wider. Wenn während einer Belichtung die Fluoreszenz ihr maximales Niveau F_∞ erreicht, so liegt gemäß der Hypothese der primäre Akzeptor in reduzierter Form (Q^-) vor.

Da nach einer Dunkelzeit von genügender Länge die Fluoreszenzinduktion in nahezu der ursprünglichen Form wieder beobachtet werden kann, muß angenommen werden, daß Q^- in der Dunkelzeit reoxidiert wurde. Bei Anwesenheit von DCMU ist eine Reoxidation von Q^- durch die Elektronentransportintermediate auszuschließen, da DCMU den Elektronenfluß nahe bei Q blockiert. Folglich muß eine andere Reaktion die Reoxidation von Q^- bewirken. Als solche wird eine Reaktion zwischen Q^- und dem oxidierten primären Elektronendonator für Photosystem II (Z^+) angenommen. Es ist nicht bekannt, ob Q^- und Z^+ direkt rekombinieren oder ob mehrere Reaktionen in eine solche Rückreaktion einbezogen sind.

Die Photoreaktion des Photosystem II läßt vereinfacht folgendermaßen formulieren:

$$Z\ P\ Q \xrightarrow{h\nu} \longrightarrow Z^+\ P\ Q^-$$

wobei Z und Q den primären Donator bzw. den primären Akzeptor und P das aktive Pigment symbolisieren. Die beiden Pfeile sollen andeuten, daß das Reaktionsprodukt als Ergebnis von mehreren dazwischenliegenden Reaktionsschritten aufgefaßt werden kann. Die Rückreaktion läßt sich als Umkehrung der Lichtreaktion verstehen und wird als Ursache für die Lumineszenz angesehen (LAVOREL, 1975).

Artifizielle Donatoren für Photosystem II hemmen die Rückreaktion. Dieser Befund wurde abgeleitet aus einer gehemmten Regeneration des Induktionsverlaufes der Fluoreszenz (BENNOUN, 1970; HOMANN, 1971). BENNOUN interpretiert die Wirkung des artifiziellen Donators Hydroxylamins mittels einer Reduktion von Z^+. Wenn Z^+ durch einen Elektronendonator reduziert wird, steht es für eine Reaktion mit Q^- nicht mehr zur Verfügung.

$$Z^+\ P\ Q^- + D \longrightarrow Z\ P\ Q^- + D^+$$

wobei D einen artifiziellen Donator bezeichnen soll.

Ebenso können die Phenylhydrazone CCCP (HOMANN, 1971; IKEGAMI und KATOH, 1973) und FCCP (CRAMER und BOHME, 1972) die Rückreaktion zwischen Q^- und Z^+ hemmen. Neben diesem Effekt ist für CCCP ein Einfluß am wasserspaltenden Enzym Y (siehe Einleitung) beobachtet worden (RENGER, 1969, 1972). so konnte RENGER feststellen, daß die Deaktivierung

der S_2 und S_3-Zustände des wasserspaltenden Enzyms durch CCCP beschleunigt wird (ADRY*-Effekt).

Beide beschriebenen Effekt von CCCP, die Hemmung der Rückreaktion und des ADRY-Effekts,können durch eine reduzierende Wirkung von CCCP auf natürliche System II-Donatoren gedeutet werden (HOMANN, 1971; RENGER, 1969). Diese mögliche Erklärung wurde für den ADRY-Effekt aus stöchiometrischen Gründen ausgeschlossen (RENGER, 1972). Es ist deswegen anzunehmen, daß die Wirkungsmechanismen von CCCP und von Elektronendonatoren für PS II bezüglich der Rückreaktion verschieden sind.

3.9.2. Der Bezug der Fluoreszenzinduktionskurven zur Rückreaktion von PS II

Wie schon unter 3.1. besprochen wurde, ist die Fläche über der Induktionskurve proportional zu der Anzahl der oxidierenden Equivalente (MALKIN und KOK, 1966). Bei Gegenwart von DCMU ist diese Anzahl identisch mit der Menge an primärem Akzeptor Q. Bei Untersuchungen der Rückreaktion wird zunächst die Fläche über der Induktionskurve der Emission bei einer Erstbelichtung von vorverdunkelten Chloroplasten als Bezugsgröße genommen. Im definierten zeitlichen Abstand wird bei der gleichen Probe eine Zweitbelichtung gegeben und

*ADRY = Acceleration of the deactivation reaction of the watersplitting enzyme Y.

wieder die Fläche bestimmt. Der Vergleich der Flächen erlaubt eine Aussage über das Ausmaß der Rückreaktion.

Eine andere Möglichkeit, das Ausmaß der Rückreaktion festzustellen, ist die Auswertung der Relationen F_o/F_∞ für die Erst- und Zweitbelichtung. Bei diesem einfacheren Verfahren wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei der Auswertung der Flächen. Dies ist in Abb. 27 am Beispiel der Hemmung der Rückreaktion durch CCCP dargestellt. Eine Hemmung der Rückreaktion drückt sich in einem Anstieg des F_o/F_∞-Verhältnisses, jedoch in einem Abfall der Größe der Flächen aus. Um die beiden Methoden vergleichen zu können, wurde in Abb. 27 F_∞/F_o dargestellt.

3.9.3. Der Einfluß von oxidiertem PMS auf die Rückreaktion

Wie in Abb. 28 gezeigt ist, hat PMS auf das Ausmaß der Rückreaktion innerhalb einer Dunkelzeit von zwei Minuten bei unbehandelten Chloroplasten keinen Einfluß (Kurve a und b). Kurve c zeigt den typischen Verlauf der Fluoreszenzinduktion in zwei aufeinanderfolgenden Belichtungen bei Anwesenheit einer sättigenden Konzentration an CCCP. Die Rückreaktion ist zwar beträchtlich, aber nicht komplett gehemmt. Ist neben CCCP zusätzlich PMS anwesend (20 µM), so wird die Hemmung zum Teil wieder aufgehoben (Kurve d).

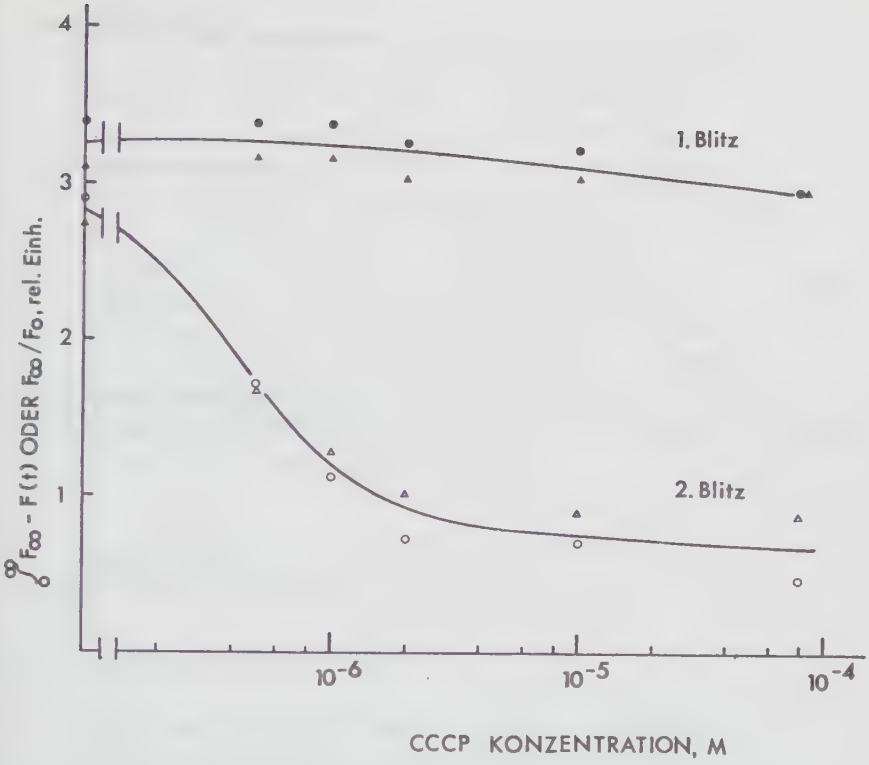


Abb. 27: Hemmung der Dunkelrestoration der Fluoreszenz-induktion durch CCCP (Methodenvergleich)

Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 µM DCMU, 5 mM $MgCl_2$, Chloroplasten (8 µg Chl/ml) und CCCP in den angegebenen Konzentrationen. Anregungslicht: Maximum bei 595 nm, $3{,}4 \times 10^4$ erg/cm^{2}sec. Dauer des 1. Blitzes: 125 msec. Dunkelzeit zwischen den Blitzen: 2 min.
○, ● Flächen über den Induktionskurven,
△, ▲ F_o und F_∞ wurden ausgewertet.
Beachte: In den folgenden Abbildungen ist F_o/F_∞ aufgetragen

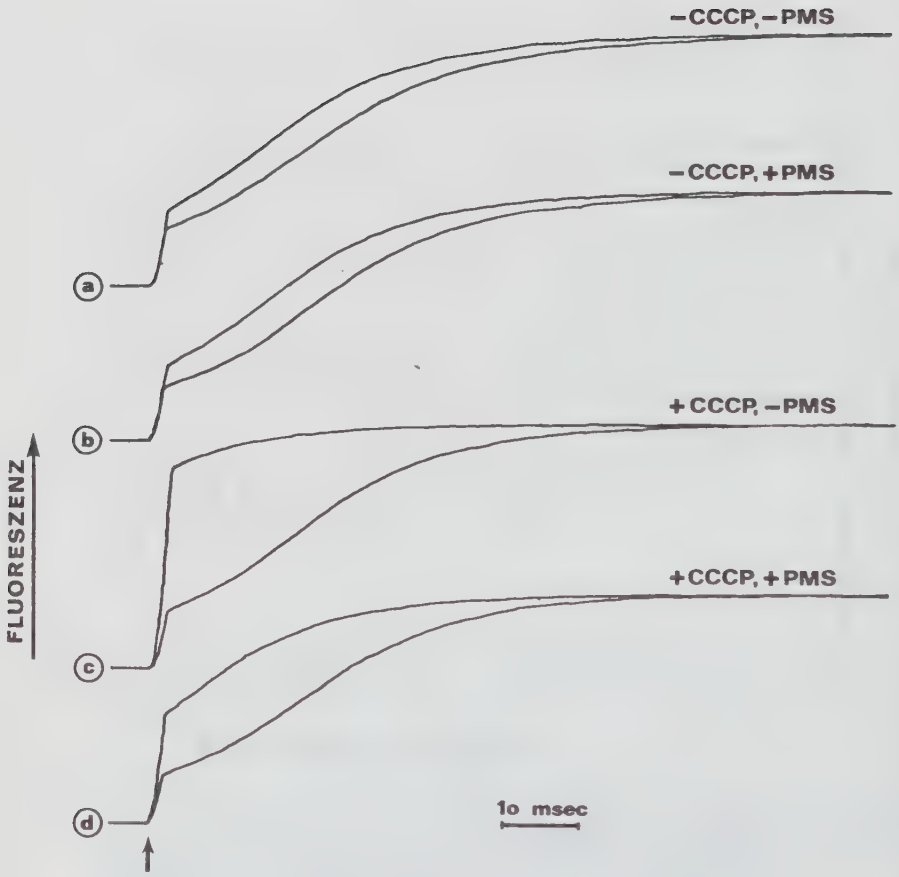


Abb. 28: Der Einfluß von CCCP und von PMS auf die Dunkelrestoration der Fluoreszenzinduktion

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 27. Wo angegeben waren 40 µM CCCP und 20 µM PMS anwesend.

Das Ausmaß der Regeneration der Rückreaktion durch 20 µM PMS ist bei allen verwendeten CCCP-Konzentrationen weitgehend gleich. Im Vergleich zu Kontrollen, die kein CCCP hatten, wird innerhalb der gegebenen Dunkelzeit durch 20 µM PMS die Rückreaktion zu ca. 65 % regeneriert (Abb. 29).

In Abb. 30 ist das F_o/F_∞-Verhältnis in CCCP-behandelten Chloroplasten als Funktion der PMS-Konzentration dargestellt. Im Vergleich zu Kontrollen, deren Rückreaktion nicht durch CCCP gehemmt war, wird innerhalb der Dunkelzeit bei Anwesenheit von CCCP und 30 µM PMS die Rückreaktion wieder zu ca. 80 % ermöglicht.

3.9.4. Die Kinetik der Rückreaktion

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen lediglich, daß die durch CCCP bewirkte Hemmung der Rückreaktion von Photosystem II innerhalb einer Dunkelzeit von zwei Minuten durch PMS weitgehend aufgehoben werden kann.

Im weiteren soll festgestellt werden, ob die Rückreaktion bei normalen DCMU-gehemmten Chloroplasten und die durch PMS regenerierte Rückreaktion auch in kinetischer Hinsicht übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurde die Dunkelzeit zwischen den beiden Belichtungen variiert (siehe 'Methoden'). Bei diesen Experimenten wurden die Flächen über den Induktionskurven ausgewertet.

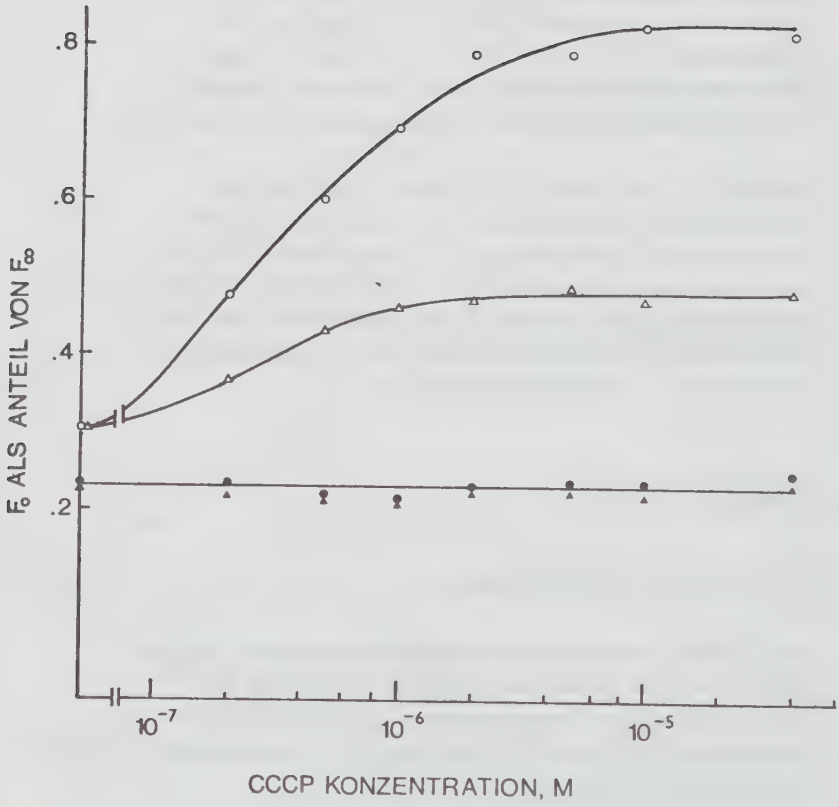


Abb. 29: Die Hemmung der Rückreaktion durch CCCP und die Regeneration durch PMS

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb 27. CCCP war in den angegebenen Konzentrationen anwesend. Geschlossene Symbole: 1. Blitz; offene Symbole: 2. Blitz.
○ , ● kein PMS; △ , ▲ 20 µM PMS

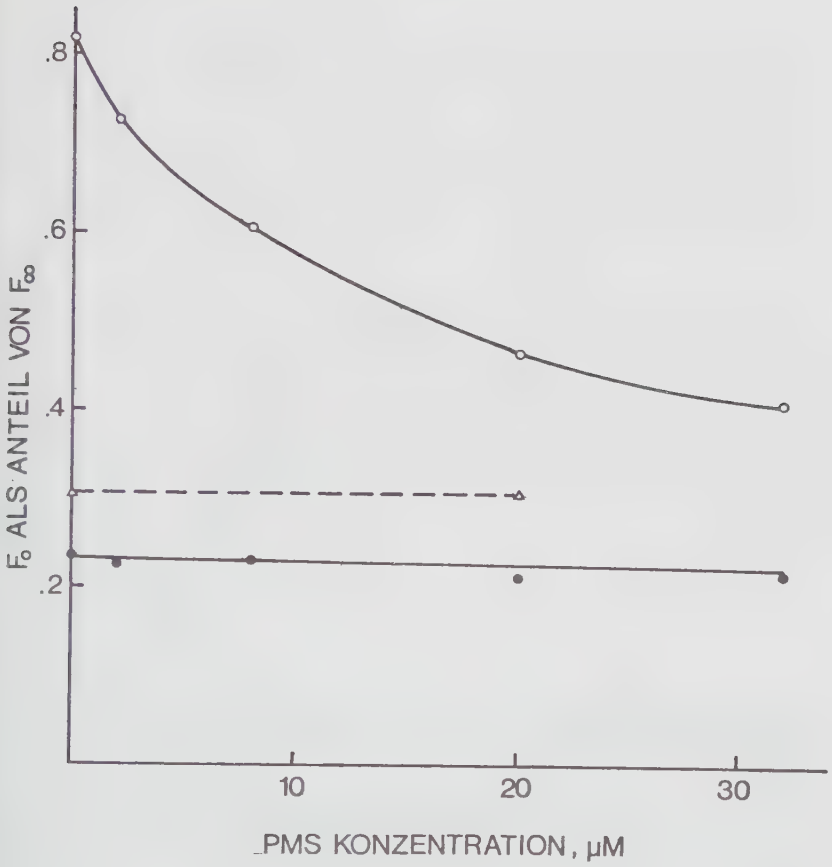


Abb. 30: Die Regeneration der durch CCCP gehemmten Rückreaktion durch durch PMS

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 27. CCCP war in einer Konzentration von 10 µM und PMS in den angegebenen Konzentrationen anwesend. Geschlossene Symbole: 1. Blitz; offene Symbole: 2. Blitz. Die gestrichelte Linie und die Dreiecke zeigen das Ausmaß der Rückreaktion bei Abwesenheit von CCCP

Der in Abb. 31 gezeigte zeitliche Verlauf der Rückreaktion in DCMU-behandelten Chloroplasten stimmt gut überein mit den in der Literatur angegebenen Werten (BENNOUN, 1970; HOMANN, 1971). Die Zeit für eine 50 %ige Rückreaktion variiert zwischen 2 und 3 Sekunden. Unter diesen Bedingungen hat PMS keinen signifikanten Einfluß (Abb. 31).

Einen wesentlich langsameren Verlauf zeigt die Rückreaktion bei Gegenwart von CCCP und PMS. Abb. 32 zeigt die Kinetiken der Rückreaktion für normale DCMU-behandelte Chloroplasten und für Chloroplasten, die mit CCCP und PMS inkubiert waren. Das Ergebnis läßt einen unterschiedlichen Mechanismus für die beiden dargestellten Fälle vermuten.

3.9.5. Wirkungsweise von CCCP und PMS bezüglich der Rückreaktion von PS II

Die hemmende Wirkung von CCCP auf die Rückreaktion scheint auf einer relativ festen Bindung im Bereich der Reaktionszentren von System II zu beruhen. Bei intermediären Konzentrationen an CCCP reagiert ein Teil der Reaktionszentren mit CCCP, wobei deren Rückreaktion blockiert wird. Bei einer anderen Fraktion von Zentren, die nicht mit CCCP reagiert haben, kann die Rückreaktion ungehindert ablaufen. Dies geht aus Abb. 33 hervor, die zeigt, daß bei einer intermediären Konzentration die Rückreaktion nur bis zu einem

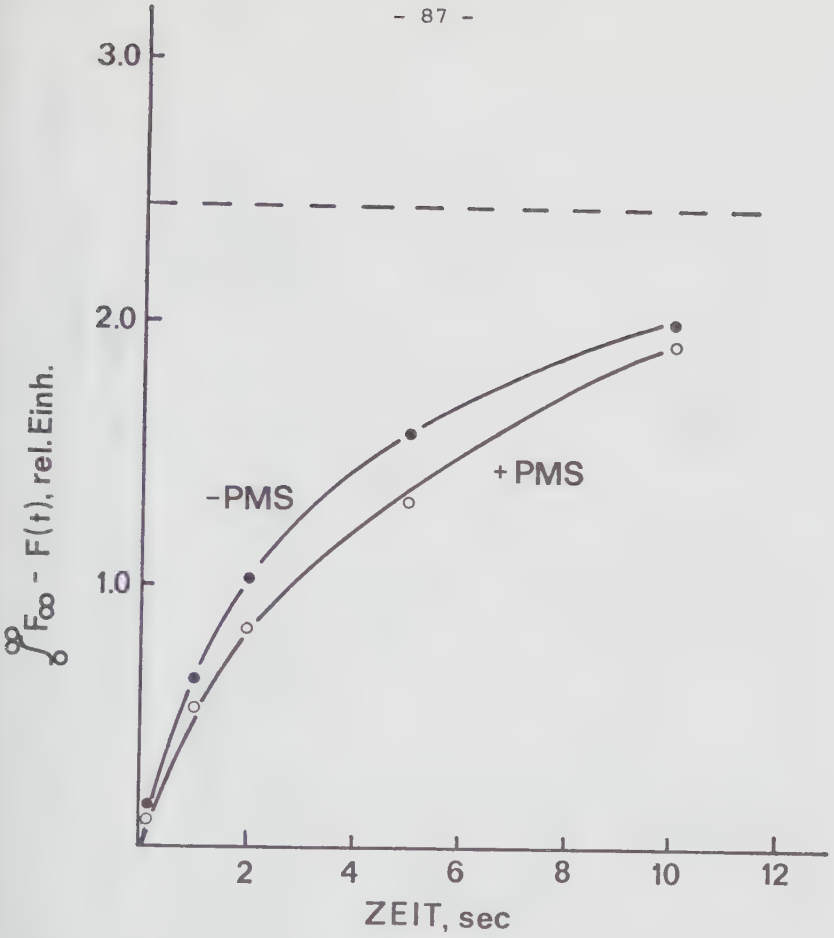


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf der Restoration der Fluoreszenzinduktion

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 27, jedoch ohne CCCP im Ansatz. Wo angegeben waren 20 µM PMS anwesend. Die angegebene Zeit entspricht der Dunkelzeit nach dem 1. Blitz (s. 'Methoden'). Die gestrichelte Linie zeigt die relative Fläche über der Induktionskurve nach einer Dunkelzeit von 2 min.

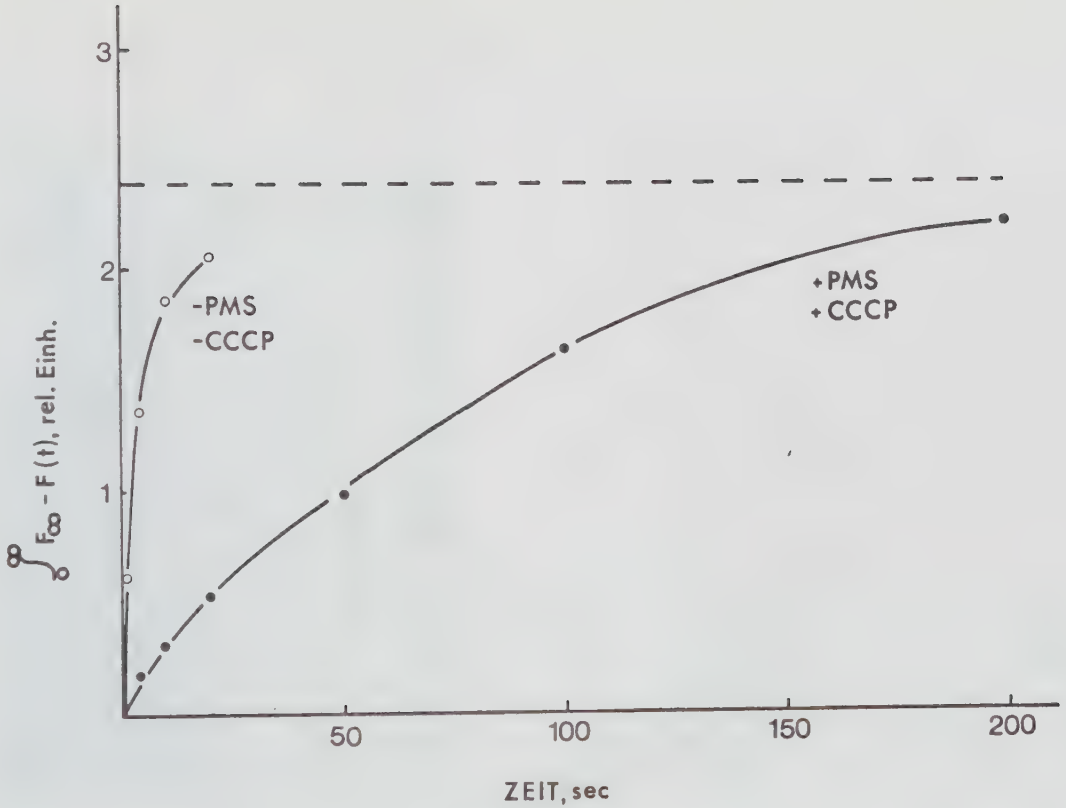


Abb. 32: Zeitlicher Verlauf der durch PMS regenerierten Rückreaktion

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 27. Wo angegeben waren 10 µM CCCP und 30 µM PMS anwesend. Die angegebene Zeit entspricht der Dunkelzeit nach dem 1. Blitz. Die gestrichelte Linie entspricht der Fläche nach einer Dunkelzeit von 2 min.

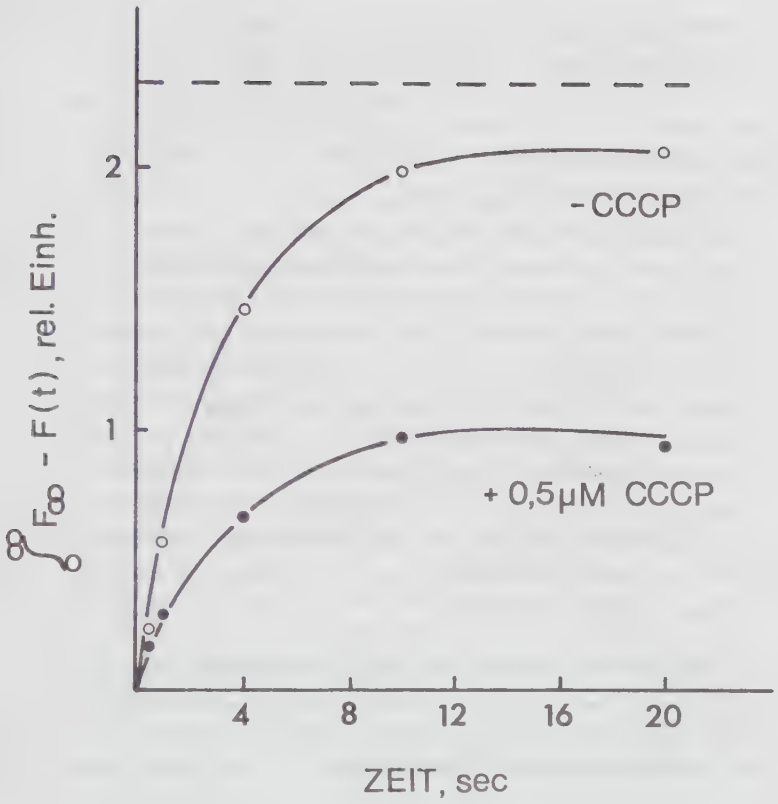


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf der Rückreaktion bei einer intermediären CCCP-Konzentration

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 27. Wo angegeben waren 0,5 µM CCCP anwesend. Die gestrichelte Linie zeigt die relative Fläche nach einer Dunkelzeit von 2 min bei Abwesenheit von CCCP.

intermediären Ausmaß abläuft, wohingegen die kinetischen Charakteristika erhalten bleiben.

Der regenerierende Effekt von PMS auf die durch CCCP gehemmt Rückreaktion kann durch zwei Mechanismen erklärt werden:

1) PMS beeinflußt die Bindung von CCCP und ermöglicht so wieder (mit veränderter Kinetik zwar) die Rückreaktion auf dem normalen Reaktionsweg.

2) PMS katalysiert unter den hemmenden Bedingungen von CCCP direkt die Rückreaktion, indem es selbst an einer Redox-Reaktion teilnimmt. Nach diesem Mechanismus würde PMS also einen zyklischen Elektronentransport von System II katalysieren können. Es ist schwierig, zwischen beiden möglichen Mechanismen auf experimentellem Wege zu unterscheiden.

Im zweiten Fall jedoch wird eine Donorfunktion von reduziertem PMS für Photosystem II gefordert, wofür tatsächlich experimentelle Hinweise existieren, wie im Folgenden gezeigt wird.

3.9.6. Hemmung der Rückreaktion von PS II durch reduziertes PMS

Es ist seit längerem bekannt, daß artifizielle Donatoren für PS II die Rückreaktion hemmen (BENNOUN, 1970; HOMANN, 1971; IKEGAMI und KATOH, 1973). Diese Befunde wurden dahingehend

interpretiert, daß der oxidierte primäre Donor (Z^+) durch artifizielle Donatoren reduziert wird und Z^+ für eine Reoxidation von Q^- nicht mehr zur Verfügung steht.

In Abb. 34 ist die Donatorwirkung von Hydroxylamin gezeigt (Kurve b). Die jeweils überlagerten Kurven entsprechen der 1., 2. bzw. 3. Belichtung mit einem Dunkelintervall von einer Minute. Bei Abwesenheit eines Donors wird die Fluoreszenzinduktion in der Dunkelzeit weitgehend wiederhergestellt (Kurve a). Analog zum Hydroxylamin wird durch reduziertes PMS die Rückreaktion gehemmt (Kurve c). Dieses Ergebnis wird als Hinweis für eine Donatorrolle von reduziertem PMS für PS II gewertet.

Wie Tab. IX zeigt, wird durch die Glucoseoxidase, die zur Reduktion des PMS anwesend ist, bei Abwesenheit von PMS die Rückreaktion nicht wesentlich beeinflußt.

Wenn Ascorbat als Reduktionsmittel verwendet wird, so ist schon allein durch Ascorbat eine leichte Erhöhung des F_o/F_∞-Verhältnisses zu beobachten. Dies ist konsistent mit den beschriebenen Beobachtungen, daß Ascorbat in höheren Konzentrationen als Elektronendonor für PS II dienen kann (CHIBA und OKAYAMA, 1962; KATOH und SAN PIETRO, 1967; YAMASHITA und BUTLER, 1968).

Wenn jedoch Ascorbat und PMS anwesend sind, so ist auch in diesem Fall eine zusätzliche signifikante Hemmung der Rückreaktion zu beobachten.

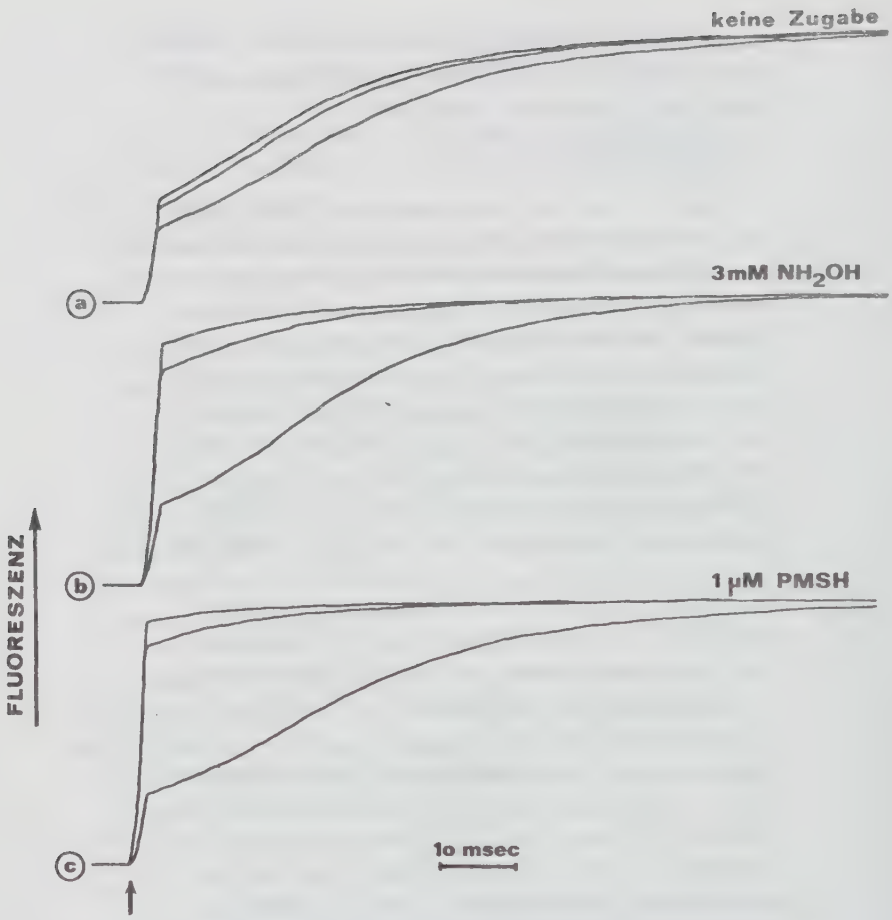


Abb. 34: Der Einfluß von NH_2OH und PMSH auf die Rückreaktion

Thunbergküvetten enthielten zusätzlich zum Reaktionsmedium: 10 µM DCMU, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Glucose, Chloroplasten (7,1 µg Chl/ml) und wo angegeben 3 mM NH_2OH und 1 µM PMS. Zur Reduktion von PMS wurde 5 min vor dem 1. Blitz Glucoseoxidase (Endkonzentration ca. 1 Einh./ml) zugegeben.
Die Kurvenscharen a) b) und c) zeigen jeweils drei Fluoreszenzinduktionskurven, die von unten nach oben dem 1., 2., und 3. Blitz entsprechen. Die Blitzdauer war 250 msec, die Dunkelzeit zwischen den Blitzen 1 min.

TAB. IX:

HEMMUNG DER RUCKREAKTION VON PHOTOSYSTEM II DURCH REDUZIERTES PMS

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 34. Wo angegeben waren 5mM Glucose, 1 /uM PMS und ca. 1 Einheit/ml Glucoseoxidase anwesend. Chloroplasten = 7,1 /ug Chl/ml.

Zugesetzt	F_o/F_∞		
	1. Blitz	2. Blitz	3. Blitz
-	0,28	0,35	0,37
Enzym	0,29,	0,41	0,42
Ascorbat	0,27	0,47	0,51
PMS	0,28	0,38	0,42
PMS, Enzym	0,27	0,83	0,88
PMS, Ascorbat	0,28	0,82	0,91

Bei diesen Experimenten ist es nicht möglich, höhere Konzentrationen an reduziertem PMS zu verwenden, da sonst die Fluoreszenz signifikant gequencht wird (siehe 3.3.).

3.9.7. Der Einfluß von reduziertem PMS auf die Fluoreszenzinduktion in Tris-gewaschenen Chloroplasten

Durch Waschen von Chloroplasten mit 0.8 M Tris HCl (pH 8.0) wird die Hill-Reaktion sehr effektiv gehemmt (YAMASHITA und HORIO, 1968; YAMASHITA und BUTLER, 1969). Die Hemmstelle liegt zwischen Wasser und PS II und ist auf eine Extraktion von Mangan zurückzuführen (CHENIAE und MARTIN, 1970). Eine analoge Hemmung ist bei Hitzebehandlung (HOMANN, 1968; CHENIAE und MARTIN, 1970) bei strikter Abwesenheit von Chlorid-Ionen (HEATH und HIND, 1969) bei Bestrahlung mit UV-Licht (MALKIN und JONES, 1968; YAMASHITA und BUTLER, 1968) und bei Trypsinbehandlung (MANTAI, 1970; SELMAN und BANNISTER, 1971) zu beobachten.

Die spezifische Hemmung des Elektronentransportes durch Waschen von Chloroplasten bei hohen Tris-Konzentrationen zeigt sich auch in einer Erniedrigung der Fluoreszenzemission. Wie Abb. 35 a zeigt, ist davon nur die variable Emission betroffen. Daraus wird gefolgert, daß die Reduktion von Q unter diesen Bedingungen blockiert ist. Artifizielle Donatoren für

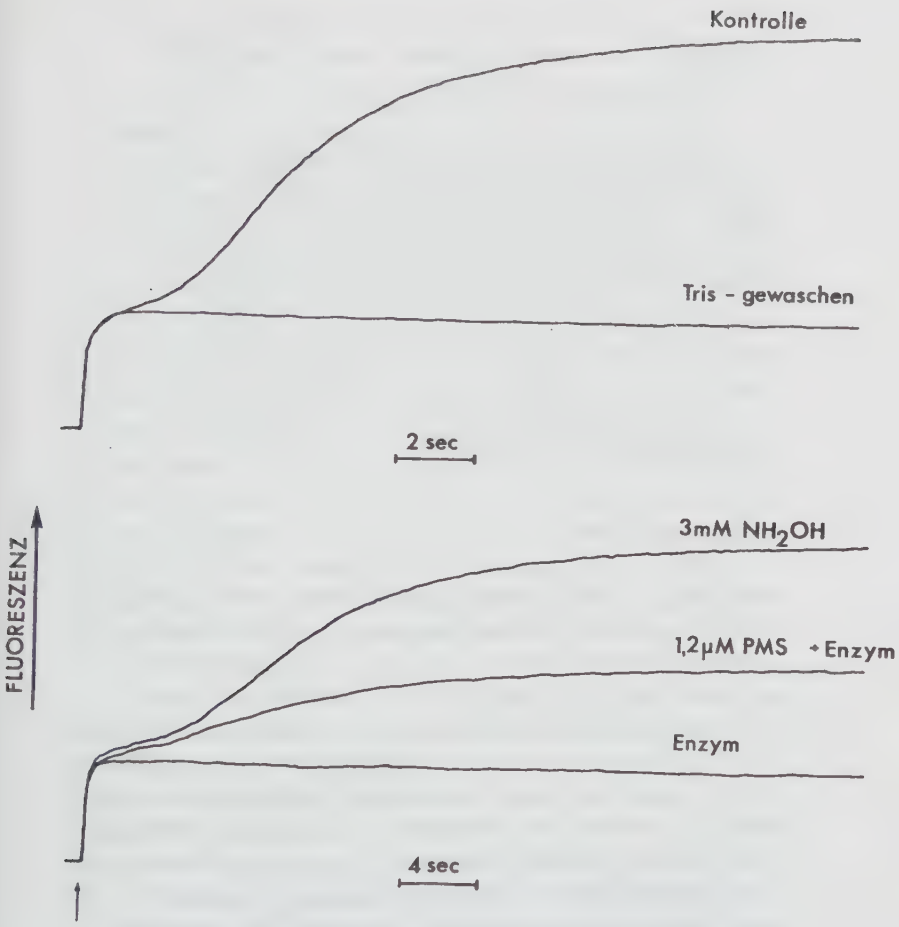


Abb. 35: Der Einfluß von NH_2OH und PMSH auf die Fluoreszenzinduktion von Tris-gewaschenen Chloroplasten

Reaktionsansatz und Bedingungen wie in Abb. 34. Wo angegeben waren 3 mM NH_2OH bzw. 1,2 µM PMS und/bzw. ca. 1 Einh./ml Glucoseoxidase anwesend. Präparation der Tris-gewaschenen Thylakoide siehe 'Methoden'. Die überlagerten Kurven entsprechen den Induktionsverläufen von jeweils vorverdunkelten Reaktionsansätzen.

PS II können die Hemmung wieder aufheben (YAMASHITA und BUTLER, 1969a), wobei auch die Emission wieder zunimmt.

Wenn reduziertes PMS analog zum Hydroxylamin als Elektronendonor für PS II dienen kann, wie unter 3.9.6. gefolgert wurde, dann sollte es die Emission in Tris-gewaschenen Chloroplasten wieder erhöhen können. Ein derartiger Effekt ist tatsächlich zu beobachten (Abb. 35 b). Auch in diesen Experimenten kann reduziertes PMS nur in sehr niedrigen Konzentrationen verwendet werden, wegen des sonst auftretenden Quench-Effekts (siehe 3.3.).

3.10. Ergänzende Bemerkung

Nachdem die vorliegende Arbeit nahezu fetiggestellt war, ist eine Veröffentlichung zu meiner Kenntnis gelangt (HOMANN, 1976), in der eine Korrelation zwischen dem lichtinduzierten Fluoreszenz-Quench und einer transienten Absorptionsabnahme mit den spektralen Eigenschaften von PMS gezeigt wird. Der Autor vermutet eine lichtinduzierte Bindung von PMS als Ursache des Transienten. Wegen der fehlenden Proportionalität zwischen den beiden Phänomenen lehnt HOMANN einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenz-Quench und dem PMS-Transienten ab, sondern diskutiert lediglich, daß beide Reaktionen durch den selben lichtabhängigen Vorgang induziert werden. Es ist möglich daß HOMANN den komplexen Zusammenhang des Quenches und des Transienten, wie er hier gezeigt wird, nicht gesehen hat.

4. Diskussion

Als Ursache für den lichtinduzierten Quench der Fluoreszenz im PMS-System wird ein Hochenergiezustand der Thylakoidmembranen diskutiert (MURATA und SUGAHARA, 1969). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse widersprechen grundsätzlich nicht der Hypothese eines Hoch-Energie-Quenches, da tatsächlich ein entkoppler-empfindlicher lichtinduzierter Quench im DAD-System (WRAIGHT undCROFTS, 1970) bestätigt werden konnte. Im PMS-System dagegen, gibt es nach den vorliegenden Daten Bedingungen, unter denen ein lichtinduzierter Quench stattfindet, der nicht mit der Hypothese des Hoch-Energie-Quenches zu vereinbaren ist. Die wesentlichen Argumente dafür sind die Tatsache, daß der lichtinduzierte Quench unter Bedingungen abläuft, die keine Photophosphorylierung erlauben, und die fehlende Empfindlichkeit gegenüber einer Reihe von Entkopplern.

Es bleibt zu fragen, ob nicht im PMS-System unter phosphorylierenden Bedingungen ein Hoch-Energie-Quench stattfindet. Tatsächlich ist, wie in der Literatur beschrieben, unter bestimmten Bedingungen ein entkoppler-empfindlicher Quench der Emission im PMS-System zu beobachten. So wurde von HOMANN (1976) gezeigt, daß die Sensitivität des Quenches gegenüber Entkopplern erheblich zunimmt, wenn der Reaktionsansatz zusätzlich 1 mM Ascorbat enthält. Unter diesem Aspekt sind wahrscheinlich die Befunde von MURATA und SUGAHARA (1969) zu verstehen, die im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen eine Hemmung des Quenches durch Methylamin beobachtet haben. Der Reaktionsansatz dieser

Autoren schloß ebenfalls Ascorbat ein. Das Ausmaß einer PMS-Reduktion durch Ascorbat in den Arbeiten von MURATA und SUGAHARA (1969) und HOMANN (1976) scheint sehr niedrig zu sein, da bei diesen Autoren keine oder nur eine unwesentlich erniedrigte Emission bei Anwesenheit von PMS und Ascorbat zu sehen ist. Dieser Schluß liegt nahe, weil reduziertes PMS die Emission sehr effektiv quenchen würde (SCHMIDT, 1975). Zusammenfassend bleibt zu vermuten, daß sich unter phosphorylierenden Bedingungen ein Hoch-Energie-Quench und ein Quench überlagern, der mit der Bindung von oxidiertem PMS korreliert.

Im weiteren soll die Frage diskutiert werden, wie ein Zusammenhang zwischen der Bindung von PMS an die Thylakoide, dem Bleichen des Kofaktors und dem Löschen der Fluoreszenz erklärt werden kann. Ausgangsbasis dafür sind drei Parameter, welche die Fluoreszenzhöhe beeinflussen können.

1) Der Redox-Zustand von Q, dem primären Akzeptor von Photosystem II: Nach der Hypothese von DUYSENS und SWEERS (1963) spiegelt die Höhe der variablen Fluoreszenz den Redox-Zustand von Q wider. Bei Gegenwart von DCMU kann Q, das im Licht reduziert wurde, nicht durch endogene Elektronentransport-Intermediate reoxidiert werden. Eine Reoxidation von Q^- durch PMS hingegen, könnte das Absinken der Emission erklären. Ein Hinweis für eine Akzeptorwirkung von PMS ist im Fall der Regeneration der CCCP-gehemmten Rückreaktion von System II (Abb. 28) gezeigt worden. Da jedoch die Kinetik der regenerierten Rückreaktion (Abb. 32) sehr lamgsam ist, und PMS auf die Kinetik der Rückreaktion bei Abwesenheit von CCCP keinen signifikanten Einfluß hat (Abb. 31), ist zweifelhaft, ob eine Reoxidation von Q^- unter den gegebenen Bedingungen abläuft, deren Ausmaß das gezeigte Absinken der Emission erklären würde. Es ist jedoch

denkbar, daß unter den Bedingungen einer längerfristigen Belichtung, während der PMS an die Membranen gebunden wird, eine Akzeptorwirkung des Kofaktors zum Tragen kommt.

2) Stimulierung der Fluoreszenz durch Mg^{2+} und die lichtinduzierte Umkehrung des Vorgangs: Von KRAUSE (1973, 1974) wurde zuerst gezeigt, daß bei intakten Chloroplasten eine lichtinduzierte elektronentransport-abhängige Abnahme der Emission stattfindet. Da in osmotisch aufgerochenen Chloroplasten der Effekt durch Mg^{2+} regeneriert werden konnte, wurde spekuliert (KRAUSE, 1974), daß ein lichtabhängiger Export von Mg^{2+} im Gegentausch zu einer Protonenaufnahme induziert wird, und so die fluoreszenz-erhöhende Wirkung von Mg^{2+} (HOMANN, 1969; MURATA, 1969) aufgehoben wird. Diese Folgerung ziehen auch BARBER et al. (1974, 1974a) aus ihren Experimenten mit dem ionophoren Antibiotikum A 23187. Die Interpretation findet ferner Unterstützung durch die Ergebnisse von HIND et al. (1974), die mittels ionenselektiver Elektroden Hinweise für einen Mg^{2+}-Export erbracht haben. Im Gegensatz dazu haben DEAMER und PACKER (1969) eine lichtinduzierte Aufnahme von Cl^{-}-Ionen bei Gegenwart von PMS gezeigt, die zum Ladungsausgleich der aufgenommenen Proteonenmenge ausreichte. Es bleibt jedoch unerwähnt, wie eine Aufnahme von PMS^{+}, die unter ähnlichen Bedingungen von LYNN (1967) gezeigt wurde, ladungsmäßig kompensiert werden sollte.

JENNINGS et al. (1976) widersprechen der Hypothese, daß ein Mg^{2+}-Export die Ursache für die von KRAUSE (1974) beschriebene Fluoreszenzabnahme ist. Vielmehr interpretieren die Autoren die Abnahme der Emission unabhängig von einem möglichen Mg^{2+}-Export

auf der Basis des Modells von BUTLER und KITAJIMA (1975), das die Verteilung der absorbierten Lichtenergie zwischen Lichtsammler-Pigmenten und Reaktionszentren und die Deexitation der angeregten Zustände beschreibt.

Es ist sicherlich zu fordern, daß mit der Bindung des kationischen Kofaktors PMS^+, wie sie in dieser Arbeit beschrieben ist, ein Ionentransport einhergeht, der die elektrische Neutralität bewirkt. Jedoch geben die Ergebnisse keine Auskunft, inwiefern dadurch die Höhe der Fluoreszenz beeinflußt wird, zumal die Interpretationshilfen aus der Literatur widersprüchlich sind.

3) Quench der Fluoreszenz durch Stoffe, die mit dem angeregten Emittor interagieren: Die Emission eines fluoreszierenden Stoffes wird beeinflußt durch die chemischen Eigenschaften der ihn umgebenden Moleküle. Eine Löschung der Fluoreszenz (Quench) kann dadurch zustande kommen, daß gewisse Stoffe (Quencher), bedingt durch ihre chemische Struktur, mit dem angeregten Emittor-Molkül in Interaktion treten können und bewirken, daß die Energie des angeregten Zustandes in Form von Wärme anstatt von Fluoreszenz freigesetzt wird. Im Idealfall stehen die Konzentration des Quenchers und die Fluoreszenz in der von STERN und VOLMER (1919) gefundenen Beziehung: $F/F_o = 1 + \alpha[Q]$, wobei F und F_o die Höhe der Emission bei Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Quenchers, [Q] die Konzentration des Quenchers und α eine Sammlung von Konstanten darstellen, welche die Lebenszeit der Fluoreszenz und die Wahrscheinlichkeit von wirksamen Kollisionen zwischen Quencher und Emittor berücksichtigen.

Es ist seit längerem bekannt, daß eine Reihe von Chinonen die Fluoreszenz des Chlorophylls löschen (LIVINGSTON und KE, 1950; THOMAS et al., 1962; ARNON et al., 1965; GAINES et al., 1965; AMESZ und FORK, 1967). Dieser Effekt ist offensichtlich unabhängig von der Akzeptorwirkung von Chinonen im photosynthetischen Elektronentransport (WARBURG und LUTTGE, 1944; TREBST et al., 1963), da er auch bei Anwesenheit von DCMU (AMESZ und FORK, 1967) und in Chlorophyll-Lösungen (LIVINGSTON und KE, 1950) zu beobachten ist. Ein fluoreszenzlöschender Effekt ist auch für DBMIB bei Raumtemperatur und bei -196°C beobachtet worden (LOZIER und BUTLER, 1972; KITAJIMA und BUTLER, 1975).

PMS kann in seiner oxidierten und reduzierten Form in analoger Weise die Chlorophyll-Fluoreszenz löschen (PAPAGEORGIOU, 1975; SCHMIDT,1975). Bei den hier beschriebenen Ergebnissen kommt der Quench durch oxidiertes PMS dadurch zum Ausdruck, daß das Anfangsniveau der Emission (Abb. 15) vor Einsetzen des lichtinduzierten Quenches stets niedriger als als die Emission bei Abwesenheit von PMS und die Differenz eine Funktion der PMS-Konzentration ist (nicht gezeigt). In Tab. wurde gezeigt, daß auch ein anderes Phenazinderivat, das Pyocyanin, die Emission herabsetzt. Im Vergleich der Effektivität als Quencher der Chlorophyll-Fluoreszenz in Thylakoiden läßt sich folgende Reihe aufstellen: $PMS_{ox} < Pyocyanin_{ox} < PMS_{red} \cong Pyocyanin_{red}$. Die gleiche Reihe ergibt sich, wenn die Stoffe nach ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln geordnet werden (HAUSKA, 1972). PMS_{ox} trägt eine positive Ladung, und ist der hydrophilste Stoff in dieser Reihe. Pyocyanin liegt formal als Zwitter-

ion vor, die Ladungen können sich jedoch durch Mesomerie aufheben und die relativ lipophilen Eigenschaften bewirken. PMS_{red} und $Pyocyanin_{red}$ sind im verwendeten pH-Bereich weitgehend ungeladen und stark lipophil. MPS_{ox} und MPS_{red}, die sulfonierten, geladenen Derivate von PMS, sind stark hydrophil (HAUSKA, 1972). Ihre Anwesenheit hat keinen signifikanten Quench der Emission in Thylakoiden zur Folge.(nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist also festzustellen, daß die Wirksamkeit der Phenazinderivate als Quencher der Chlorophyllfluoureszenz in Thylakoiden mit der Lipophilizität der Derivate korreliert. PMS quencht die Emission von gelöstem Chlorophyll (PAPAGEORGIOU, 1975), reduziertes PMS ist in DCMU-vergifteten Thylakoiden ein sehr wirksamer Quencher (SCHMIDT, 1975), und beide Effekte gehorchen einer Stern-Volmer-Relation. Es besteht also kaum ein Zweifel, daß die Phenazine die Chlorophyllfluoreszenz dadurch quenchen, daß sie mit dem angeregten Emittor interagieren. Die Korrelation zwischen der Lipophilizität der Phenazine und ihrer Wirksamkeit als Quencher in Thylakoiden ist unter diesem Aspekt einfach zu erklären: Quencher-Moleküle müssen Zugang zu den emittierenden Chlorophyll-Molekülen innerhalb der Lipo-Protein-Membran der Thylakoide haben, um wirksam zu sein. Lipophile Agentien sind in ihrer Diffusion in die Membranen klarerweise begünstigt.

Es bleibt zu fragen, inwiefern der lichtinduzierte Quench der Emission bei Gegenwart von PMS in dieses Konzept einzuordnen ist. Wenn das Absinken der Emission durch eine Interaktion von PMS mit dem emittierenden Chlorophyll bedingt ist, so ist zu fordern, daß sich

die Rate der wirksamen Kollisionen als Folge einer lichtabhängigen Reaktion erhöht. Im einfachsten Fall ist dies möglich, wenn sich die Konzentration des Quenchers erhöht. Genau dies ist zu beobachten, wie die PMS-Bindungsexperimente gezeigt haben. Während der Belichtung wird PMS an die Membranen gebunden und bei anschließender Dunkelheit wieder entlassen. Anhand der Menge an gebundenem PMS (0,5 bis 1 /umol/ /umol Chlorophyll bei hoher Lichtintensität) ist zu schließen, daß sich die lokale Konzentration des Kofaktors in der Thylakoidmembran beträchtlich erhöht. Dieser Schluß ist selbst unter der Annahme berechtigt, daß PMS überwiegend in den Thylakoidinnenraum aufgenommen wird.

Die lokale Konzentration an PMS in der Umgebung der Fluoreszenzemittoren bestimmt das Ausmaß des Quenches. Eine Stern-Volmer-Beziehung zwischen der Menge an gebundenem PMS und dem Fluoreszenz-Quench ist nur dann zu erwarten, wenn mit zunehmender Bindung von PMS eine lineare Konzentrationserhöhung von PMS in unmittelbarer Umgebung der Emittoren einhergeht. Dies ist jedoch nicht a priori zu erwarten. Wie Abb. zeigt, besteht keine lineare Beziehung zwischen dem PMS-Transienten und dem Quench. Die Wurzelbeziehung kann sich rein zufällig ergeben haben, kann aber auch Ausdruck eines bestimmten Mechanismus sein. In dem dargestellten hypothetischen Modell wird von einer Reaktion

$$P^{II} + P \rightleftharpoons 2P^{I}$$

ausgegangen, wobei P die Konzentration des zugesetzten PMS und P^{I} und P^{II} die Konzentratration zweier entstehender hypothetischer Spezies sein soll. Unter der Annahme, daß P groß im Vergleich zu den anderen Spezies

ist, und daß der Transient durch P^{II} verursacht wird, ergibt sich aus der Gleichgewichtsbedingung

$$[P^I]^2 = K'[\Delta A]$$

wobei $K' = K[P]$. Wenn P^I die quenchende Spezies ist, ergibt die Stern-Volmer-Beziehung

$$\frac{F_o}{F} = 1 + \alpha [K'\Delta A]^{1/2}$$

Andere Möglichkeiten sind, daß α variabel ist und von der Menge an gebundenem PMS abhängt, oder daß der Transient kein lineares Maß für die Menge an gebundem PMS ist. Um zwischen diesen und anderen möglichen Mechanismen zu unterscheiden, sind weitere Experimente nötig.

Durch welchen Mechanismus kommt es zu einer lichtinduzierten Bindung von PMS? Nach der Entdeckung von PMS als Katalysator der Photophosphorylierung (JAGENDORF und AVRON, 1958) deuten alle Befunde daraufhin, daß der Kofaktor in einen Photosystem I -Elektronentransport als Redox-komponente einbezogen ist (JAGENDORF und AVRON, 1959; HAUSKA et al., 1969; 1973; WITT et al., 1968). Es liegt deshalb nahe, zu vermuten, daß die photochemischen Reaktionen, die zur Bindung von PMS führen, von System I ausgehen. Tatsächlich ist auch unter den Bedingungen, unter denen die Bindung gemessen wurde, ein Elektronenfluß durch P_{700} zu beobachten. Um jedoch überhaupt einen P_{700}-Elektronenfluß zu bekommen, ist zu fordern, daß zugegebenes oxidiertes PMS zunächst reduziert wird, ehe es an einem zyklischen Transport teilnehmen kann. Als Reduktanten kommen unter den Meßbedingungen nur reduzierte Elektronentransport-Intermediate in Frage. Tatsächlich scheint im Fließgleichgewicht nur wenig PMS im reduzierten Zustand vorzuliegen, da ein Zusatz von Ascorbat die Relaxationszeit von P_{700} erheblich verkleinert.

Für eine System I-Aktivität als Ursache der PMS-Bindung spricht auch der Befund, daß der Plastochinonantagonist DBMIB (BÖHME et al., 1971) die Anfangsrate und die Amplitude des PMS-Transienten stark hemmt (nicht gezeigt).

Die unter 3.9. beschriebenen Ergebnisse, die eine Interaktion von PMS mit System II zeigen, lassen jedoch prinzipiell als Ursache der PMS-Bindung auch eine Aktivität des Systems II in Frage kommen. Dadurch ließe sich auch einfacher die hemmende Wirkung von CCCP auf die Bindung von PMS erklären. Seit längerem ist nämlich bekannt, daß neben der Entkopplerwirkung CCCP in höheren Konzentrationen ein Hemmstoff des Elektronentransportes im Bereich von System II ist (KIEWIT et al., 1965; ITOH et al., 1969; MANTAI, 1969; RENGER, 1969). Weiterhin wird die Aktivität von System I, gemessen mittels des P_{700}-Elektronenflusses durch CCCP nicht wesentlich beeinflußt, während die Bindung fast vollständig gehemmt werden kann.

Unabhängig davon, ob Photosystem I- oder/und II-Reaktionen für die Bindung des PMS verantwortlich sind, ist zu vermuten, daß der kationische Kofaktor an negativ geladene Gruppen gebunden wird, die in einer lichtabhängigen Reaktion entstehen.

Die unter 3.9. beschriebenen Ergebnisse weisen auf eine Interaktion von oxidiertem und reduziertem PMS mit Photosystem II hin. Fluoreszenz-Induktionskurven bei vorverdunkelten und DCMU-vergifteten Chloroplasten reagieren empfindlich auf System II-hemmende und reaktivierende Behandlungen. So zeigt sich nach einer Tris-Behandlung, wodurch der Elektronentransport

im Bereich des wasserspaltenden Enzyms blockiert wird, eine drastische Hemmung der variablen Fluoreszenz (Abb. 35). Artifizielle Donatoren können diesen Effekt teilweise wieder aufheben (YAMASHITA und BUTLER, 1969). Die bei Gegenwart von DCMU beobachtete Restoration des Emissionsverlaufes im Dunkeln nach vorangegangener Belichtung wird mit einer Rekombination des reduzierten primären Akzeptors (Q^-) und des oxidierten Donators (Z^+) erklärt (HEBER und FRENCH, 1968). Auch diese Reaktion reagiert empfindlich auf den Einfluß von artifiziellen Donatoren (BENNOUN, 1970; HOMANN, 1971). Aus Messungen von Induktionskurven an Tris-behandelten Chloroplasten und der Rückreaktion geht übereinstimmend eine Donatorfunktion des reduzierten PMS für Photosystem II hervor. Die Regeneration der durch CCCP gehemmten Rückreaktion bei Gegenwart von oxidiertem PMS weist darauf hin, daß die Reaktion zwischen Q^- und Z^+ - mit einer veränderten Kinetik zwar - wieder abläuft. Eine Erklärung dafür kann sein, daß PMS in die Redoxreaktion zwischen Q^- und Z^+ eingeschaltet wird und einen zyklischen Elektronentransport des Systems II katalysiert, der unter diesen Bedingungen langsam abläuft. Ob ein solcher Zyklus unter anderen Bedingungen, z.B. im Dauerlicht, mit höheren Raten wirksam ist, läßt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten. Die möglichen Angriffsstellen von CCCP, DCMU, Tris, NH_2OH (Elektronendonor für System II) und PMS sind in einem vereinfachten Schema (Abb. 36) zusammengefaßt.

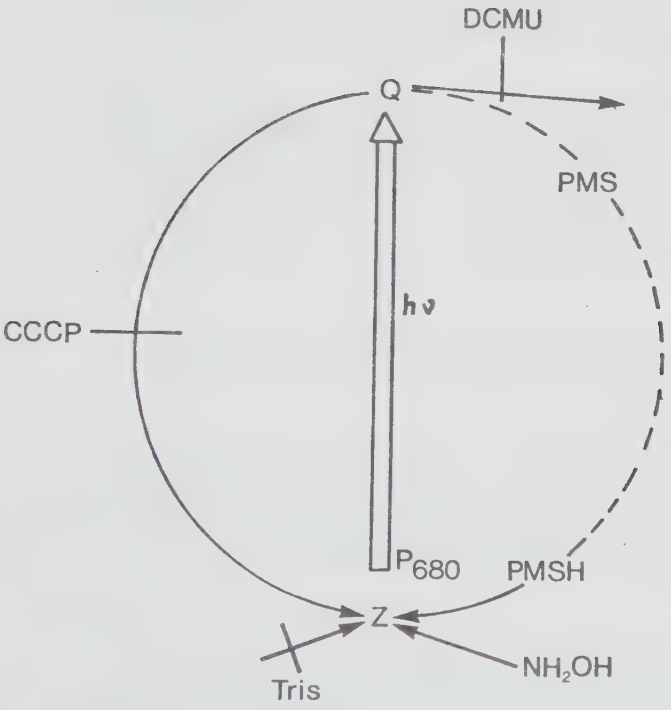


Abb. 36. Vereinfachtes Schema über die Wirkung von Tris, PMS, PMSH, NH_2OH und CCCP auf die Rückreaktion von Photosystem II. Der durchgezogene Halbkreis soll die Rückreaktion bei Abwesenheit von CCCP, der gestrichelte Halbkreis bei Anwesenheit von CCCP und PMS symbolisieren.

Zusammenfassung

Die lichtabhängige Interaktion von oxidiertem und reduziertem N-methyl phenazonium methosulfat (PMS) mit Thylakoiden aus Chloroplasten von Pisum sativum wurde untersucht, und folgende Ergebnisse wurden gefunden:

1) Reduziertes PMS ist ein sehr effektiver Quencher der Chlorophyll-Fluoreszenz in Thylakoiden. Beide Phasen der Emission, die schnelle Anfangsphase F_o und die variable Fluoreszenz werden gelöscht, mit einem deutlicherem Effekt bezüglich der variablen Emission. Die Fluoreszenz-Löschung durch reduziertes PMS gehorcht der Stern-Volmer-Relation und wird deshalb damit erklärt, daß reduziertes PMS mit dem angeregten Emittor interagiert.

2) Oxidiertes PMS verursacht in DCMU-vergifteten Thylakoiden eine lichtinduzierte Abnahme der Fluoreszenz, die seit längerem bekannt ist und mit einem Hoch-Energie-Zustand der Membranen erklärt worden ist.

   Es wird gezeigt, daß diese Fluoreszenz-Löschung unter Bedingungen stattfinden kann, unter denen keine Photophosphorylierung möglich ist, und daß der Effekt gegenüber eine Reihe von Entkopplern unempfindlich ist. Die Hypothese des Hoch-Energie-Quenches im PMS-System wird deshalb in Zweifel gezogen.

3) Eine lichtinduzierte transiente Absorptionsabnahme mit den spektralen Eigenschaften von PMS wird beschrieben und festgestellt, daß der Transient mit dem lichtinduzierten Binden von PMS an die Thylakoide korreliert. Die Absorptionsabnahme wird damit erklärt, daß PMS beim Binden an die Membranen bleicht.

4) Im qualitaiven Vergleich, getestet an einer Reihe von Parametern, ist stets eine Korrelation zwischen der Fluoreszenz-Löschung und dem PMS-Transienten zu beobachten. In quantitativer Hinsicht zeigt sich eine Abhängigkeit der Fluoreszenz-Löschung von von der Quadratwurzel des PMS-Transienten.

   Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz-Löschung und dem Binden von PMS wird diskutiert, indem angenommen wird, daß gebundenes PMS mit den angeregten Chlorophyllmolekülen interagiert.

5) Die Restoration der Fluoreszenz-Induktion in DCMU-vergifteten Thylakoiden ist seit längerem bekannt und wird mit einer Rückreaktion von Photosystem II, d.h. einer Rekombination des reduzierten primären Akzeptors und des oxidierten primären Donators von System II erklärt.

Es wird gezeigt, daß oxidiertes PMS die durch CCCP gehemmte Rückreaktion regeneriert, und daß reduziertes PMS als Donator für Photosystem II fungieren kann. Diese Ergebnisse und die Befunde aus kinetischen Untersuchungen der Rückreaktion werden dadurch erklärt, daß unter bestimmten Bedingungen PMS einen zyklischen Photosystem II-Elektronentransport katalysieren kann.

6. Literaturverzeichnis

AMESZ J.; FORK D.C.
1967 Biochim. Biophys. Acta 143, 97 - 107
Quenching of chlorophyll fluorescence by quinones in algae and chloroplasts

ARNON D.I.
1949 Plant Physiol. 24, 1 - 15
Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris

ARNON D.I.; TSUJIMOTO H.Y.; MCSWAIN B.D.
1965 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 927 - 934
Quenching of chloroplast fluorescence by photosynthetic phosphorylation and electron transport

BARBER J.; TELFER A.; NICOLSON J.
1974 Biochim. Biophys. Acta 357, 161 - 165
Evidence for divalent cation movement within isolated whole chloroplasts from studies with ionophore A 23187

BARBER J.; MILLS J.; NICOLSON J.
1974 FEBS Lett. 49, 106 - 110
Studies with cation specific ionophores show that within the intact chloroplast Mg^{2+} acts as the main exchange cation for H^{+} pumping

BENNOUN P.
1970 Biochim. Biophys. Acta 216, 357 - 363
Réoxidation du quencher de fluorescence "Q" en présence de 3-(3,4-Dichlorophényl)-1,1-dimethylurée

BÖHME H.; REIMER S.; TREBST A.
1971 Z. Naturforsch. 26 b, 341 - 352
The effect of dibromothymoquinone, an antagonist of plastoquinone, on noncyclic electron flow systems in isolated chloroplasts

BONAVENTURA S.; MYERS J.
1969 Biochim. Biophys. Acta 189, 366 - 383
Fluorescence and oxygen evolution from Chlorella pyrenoidosa

BUTLER W.; KITAJIMA M.
1975 Biochim. Biophys. Acta 376, 116 - 125
Fluorescence quenching in Photosystem II of chloroplasts

BUTLER W.; VISSER J.W.; SIMONS H.L.
1973 Biochim. Biophys. Acta 292, 140 - 151
The kinetics of light-induced changes of C-550, cytochrome b_{559} and fluorescence yield in chloroplasts

CHENIAE G.M.; MARTIN J.F.
1970 Biochim. Biophys. Acta 197, 219 - 239
Sites of function of manganese within Photosystem II. Roles in O_2 evolution and System II

CHIBA Y.;OKAYAMA S.
1962 Plant Cell Physiol. 3, 379 - 390
Photooxidation reactions by chloroplasts solubilized with surface-active agents

COHEN W.S.; SHERMAN L.A.
1971 FEBS Lett. 16, 319 - 323
Proton Translocation and energy dependent quenching of chlorophyll a fluorescence

CRAMER W.A.; BÖHME H.
1972 Biochim. Biophys. Acta 256, 358 - 369
High-potential cytochrome b_{559} as a secondary quencher of chloroplasr fluorescence in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea

DEAMER D.W.; PACKER L.
1969 Biochim. Biophys. Acta 172, 539 - 545
Light-dependent anion transport in isolated spinach chloroplasts

DELL'ANTONE P.; COLLONNA R.; AZZONE G.F.
1972 Eur. J. Biochem. 24, 566 - 576
The membrane structure studied with cationic dyes 2. Aggregation, metachromic effects and pk_a shifts

DELOSME R.
1971 in: Proc. 2nd Intl. Congr. Photosynth. Res., Stresa (G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds) Vol. 1,187-195
New results about chlorophyll fluorescence "in vivo"

DUYSENS L.M.N.
1964 Progr. Biophys. Mol. Biol. 14, 1 - 104
Photosynthesis

DUYSENS L.M.N.; SWEERS H.E.
1963 in: Japan. Soc. Plant Physiologists (eds.), Studies on microalgae and photosynthetic bacteria
Mechanism of two photochemical reactions in algae studied by means of fluorescence

FOWLER C.F.; KOK B.
1974 Biochim. Biophys. Acta 357, 308 - 318
Direct observation of a light-induced electric field in chloroplasts

GAINES G.L.; TWEET A.G.; BELLAMY W.D.
1965 J. Chem. Phys. 42, 2193 - 2199
Interaction between chlorophyll a and vitamin K_1 in monomolecular films

GOVINDJEE; GOVINDJEE R.
1975 in: Bioenergetics of Photosynthesis (Govindjee ed.) Academic Press S. 1 - 50
Introduction to photosynthesis

GROSS E.L.; PACKER L.
1967 Arch. Biochem. Biophys. 121, 779 - 789
Ion transport and conformational changes in spinach chloroplast grana I. Osmotic properties and divalent cation-induced volume changes

HAUSKA G.
1972 FEBS Lett. 28, 217 - 220
Lipohilicity and catalysis of photophosphorylation I. Sulfonated phenazonium compounds are ineffective in mediating cyclic photophosphorylation in photosystem I-subchloroplast vesicles

HAUSKA G.A.; MCCARTY R.E.; RACKER E.
1969 Biochim Biophys. Acta 197, 206 - 218
The site of phosphorylation associated with Photosystem I

HAUSKA G.; TREBST A.; DRABER W.
1973 Biochim. Biophys. Acta 305, 632 - 641
Lipophilicity and catalysis of photophosphorylation II. Quinoid components as artificial carriers in cyclic photophosphorylation and photoreductions by Photosystem I

HEATH R.L.
1973 Biochim. Biophys. Acta 292, 444 - 458
Ethyl red as a probe into the mechanism of light-driven proton translocation by isolated chloroplasts I. The spectral shift of ethyl red and membrane conformational changes

HEATH R.L.; HIND G.
1969 Biochim. Biophys. Acta 172, 290 - 299
The role of Cl^- in photosynthesis II. The effect of Cl^- upon fluorescence

HEATH R.L.; PACKER L.
1968 Arch. Biochem. Biophys. 125, 1019 - 1022
Steady state fluorescence of spinach chloroplasts and electron flow

HEBER U.; FRENCH S.
1968 Planta 79, 99 - 112
Effects of oxygen on the electron transport chain of photosynthesis

HILL R.; BENDALL F.
1960 Nature 186, 136 - 137
Function of two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis

HIND G.; NAKATANI H.Y.; IZAWA S.
1974 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1484 - 1488
Light-dependent redistribution of ions in suspensions of chloroplast thylakoid membranes

HOCH G.E.
1972 in: Methods in enzymology (A. San Pietro ed.)
Vol. 24 S. 297, Academic Press
Steady state relaxation spectrophotometry

HOFFMANN W.
1965 Radiochimica Acta 4, 117 - 119
Die Bestimmung von ß-Strahlern

HOMANN P.
1968 Biochim. Biophys. Res. Commun. 33, 229 - 234
Effects of manganese on the fluorescence of chloroplasts

HOMANN P.
1969 Plant Physiol. 44, 932 - 936
Cation effects on the fluorescence of isolated chloroplasts

HOMANN P.
1971 Biochim. Biophys. Acta 245, 129 - 143
Actions of Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone on electron transport and Fluorescence of isolated chloroplasts

HOMANN P.
1976 Plant Physiol. 57, 387 - 392
Interaction of N-Methylphenazonium Methyl Sulfate with the thylakoids of illuminated chloroplasts in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea

IKEGAMI I.; KATOH S.
1973 Plant Cell Physiol. 14, 837 - 850
Studies on chlorophyll fluorescence in chloroplasts III. Effect of artificial electron donors for Photosystem II on reoxidation of the fluorescence quencher, Q, in spinach chloroplasts

ISHIZU K.; DEARMAN H.H.; HUANG M.T.; WHITE J.R.
1969 Biochemistry 8, 1238 - 1246
Interaction of 5-methylphenazinium cation radical with deoxyribonucleic acid

ITOH M.; YAMASHITA K.; NISHI T.; KONISHI K.; SHIBATA K.
1969 Biochim. Biophys. Acta 180, 509 - 519
The site of manganese function in photosynthetic electron transport system

JAGENDORF A.T.
1975 in: Bioenergetics of Photosynthesis (Govindjee ed.) Academic Press, S. 414 - 492 Mechanisms of photophosphorylation

JAGENDORF A.T.; AVRON M.
1958 J. Biol. Chem. 231, 277 - 290 Cofactors and rates of photosynthetic phosphorylation by spinach chloroplasts

JAGENDORF A.T.; AVRON M.
1959 Arch. Biochem. Biophys. 80, 246 - 257 Inhibitors of photosynthetic phosphorylation in relation to electron and oxygen transport pathways of chloroplasts

JAGENDORF A.T.; MARGULIES M.
1960 Arch. Biochem. Biophys. 90, 184 - 195 Inhibition of spinach chloroplast photosynthetic reactions by p-chlorophenyl-1,1-dimethylurea

JAGENDORF A.T.; URIBE E.
1966 in: Brookhaven symp. Biol. 19, 215 - 245 Photophosphorylation and the chemiosmotic hypothesis

JENNINGS R.C.; GARLASCHI F.M.; FORTI G.
1976 Biochim. Biophys. Acta 423, 264 - 274 Studies on the slow fluorescence decline in isolated chloroplasts

JOLIOT P.
1965 Biochim. Biophys. Acta 102, 116 - 134 Cinétiques des réactions liées a l'émission d'oxygène photosynthétique

JOLIOT P.; BARBIERI G.; CHABAUD R.
1969 Photochem. Photobiol. 10, 309 - 329 Un nouveau modèle des centres photochimiques du system II

JOLIOT P.; JOLIOT A.; BOUGES A.; BARBIERI G.
1971 Photochem. Photobiol. 14, 287 - 305 Studies of System II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence and oxygen emission

KATOH S.; SAN PIETRO A.
1967 Arch. Biochem. Biophys. 122, 144 - 152 Ascorbate-supported NADP-photoreduction by heated Euglena chloroplasts

KAUTSKY H.; APPEL W.; AMANN H.
1960 Biochem. Z. 332, 277 - 292 Chlorophyllfluorescenz und Kohlensäureassimilation XIII. Die Fluorescenzkurve und die Photochemie der Pflanze

KEARNY E.B.; SINGER T.P.
1956 J. Biol. Chem. 219, 963 - 975
Studies on succinic dehydrogenase
I. Preparation and assay of the soluble dehydrogenase

KIEWIT D.Y.; HALL D.O.; JENNER E.L.
1965 Biochim. Biophys. Acta 109, 284 - 292
Effect of Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone on the photochemical reactions of isolated chloroplasts

KITAJIMA M.; BUTLER W.L.
1975 Biochim. Biophys. Acta 376, 105 - ;;&
Quenching of chlorophyllfluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone

KOK B.
1963 in: Photosynthetic mechanisms of green plants, Natl. Acad. Sci. - Natl. Res. Council Publ. 1145, 45 - 55
Photosynthetic electron transport

KOK B.; FORBUSH B.; MCGLOIN M.M.
1970 Photochem. Photobiol. 11, 457 - 475
Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution
I. A linear four step mechanism

KOK B.; MALKIN S.; OWENS O.; FORBUSH B.
1966 Brookhaven symposia in Biology No 19, 446 - 459
Observations on the reducing side of the O_2-evolving photoact

KOK. B.; RURAINSKI H.J.; OWENS O.V.H.
1965 Biochim. Biophys. Acta 109, 347 - 356
The reducing power generated in photoact I of photosynthesis

KOUCHKOVSKY DE Y.
1963 Dissertation, Universität von Paris
Induction photosynthétique des chloroplastes isolée

KRAUSE G.H.
1973 Biochim. Biophys. Acta 292, 715 - 728
The high-energy state of the thylakoid system as indicated by chlorophyll fluorescence and chloroplast shrinkage

KRAUSE G. H.
1974 Biochim. Biophys. Acta 333, 301 - 313
Changes in Chlorophyll fluorescence in relation to light-dependent cation transfer across thylakoid membranes

LAVOREL J.
1975 in: Bioenergetics of photosynthesis (Govindjee ed.) Academic Press, S. 225 - 319
Luminescence

LINDBERG O.; ERNSTER L.
1956 Method. Biochem. Anal. 3, 1 - 22
Phosphorus compounds by phosphate analysis

LIVINGSTON R.; KE C.L.
1950 J. Am. Chem. Soc. 72, 909 - 915
Quenching of the fluorescence of chlorophyll a solutions

LOZIER R.H.; BUTLER W.L.
1972 FEBS Lett. 26, 161 - 164
The effects of dibromothymoquinone on fluorescence and electron transport of spinach chloroplasts

LYNN W.S.
1967 J. Biol. Chem. 242, 2186 - 2191
Inhibition of photophosphorylation by phenazine methosulfate

MALKIN S.; JONES L.W.
1968 Biochim. Biophys. Acta 162, 297 - 299
Photoinhibition and excitation quenching in Photosystem II of photosynthesis, from fluorescence induction measurements

MALKIN S.; KOK B.
1966 Biochim. Biophys. Acta 126, 413 - 432
Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts I. Number of components involved in the reaction and quantum yields

MANTAI K.E.
1969 Biochim. Biophys. Acta 189, 449 - 451
Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone as an inhibitor of coupled electron transport in trypsin treated spinach chloroplasts

MANTAI K.E.
1970 Plant Physiol. 45 , 563 - 566
Some effects of hydrolytic enzymes on coupled and uncoupled electron flow in chloroplasts

MITCHELL P.
1961 Nature 191, 144 - 148
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism

MOHANTY P.; BRAUN B.Z.; GOVINDJEE
1973 Biochim. Biophys. Acta 292, 459 - 476
Light-induced slow changes in chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts: Effect of magnesium and phenazine methosulfate

MURAKAMI S.; TORRES-PERAIRA J.; PACKER L.
1975 in: Bioenergetics of Photosynthesis (Govindjee ed.) Academic Press, S. 565 - 616
Structure of the chloroplast membrane - Relation to energy coupling and ion transport

MURATA N.
1969 Biochim. Biophys. Acta 189, 171 - 181
Control of excitation transfer in photosynthesis II. Mg-ion-dependent distribution of Excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts

MURATA N.
1971 Biochim. Biophys. Acta 245, 365 - 372
Control of excitation transfer in photosynthesis V. Correlation of membrane structure to regulation of excitation transfer between two pigment systems in isolated spinach chloroplasts

MURATA N.; SUGAHARA K.
1969 Biochim. Biophys. Acta 189, 182 - 192
Control of excitation transfer in photosynthesis III. Light-induced decrease of chlorophyll fluorescence related to photophosphorylation system in spinach chloroplasts

MURATA N.; TASHIRO H.; TAKAMIYA A.
1970 Biochim. Biophys. Acta 197, 250 - 256
Effects of divalent metal ions on chlorophyll a fluorescence in isolated spinach chloroplasts

PACKER L.
1962 Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 355 - 360
Light scattering changes correlated with photosynthetic phosphorylation in chloroplast fragments

PAPAGEORGIOU G.
1975 Arch. Biochem. Biophys. 166, 390 - 399
On the mechanism of the PMS-effected quenching of chloroplast fluorescence

PAPAGEORGIOU G.
1975 a in: Bioenergetics of photosynthesis (Govindjee ed.) Academic Press, S. 319 - 371
Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis

RENGER G.
1969 Naturwissensch. 56, 370
Reaction of CCCP in Photosynthesis on an intermediate between Chlorophyll a_{II} and water

RENGER G.
1972 Eur. J. Biochem. 27, 259 - 269
Studies on the mechanism of the water oxidation in photosynthesis

RENGER G.
1974 Proc. third Intl. Congr. Photosynth., Rehovot (M. Avron ed.) Vol. 1, 127 - 144
Studies on the reaction mechanism of the oxidizing equivalents produced by System II

RENGER G.
1976 Biochim. Biophys. Acta 440, 287 - 300
Studies on the structural and functional organisation of System II of photosynthesis. The use of trypsin as a structurally selective inhibitor at the outer surface of the thylakoid membrane

RENGER G.; ERIXON K.; DÖRING G.; WOLFF CH.
1976 Biochim. Biophys. Acta 440, 278 - 286
Studies on the nature of the inhibitory effect of trypsin on the photosynthetic electron transport of System II in spinach chloroplasts

RURAINSKI H.J.
1975 Z. Naturforsch. 30c, 761 - 770
Antagonistic relationship between electron transport and P_{700} in chloroplasts and intact algae

RURAINSKI H.J.; HOCH G.E.
1972 in: Proc. 2nd Intl. Congr. Photosynth. Res. (G. Forti, M. Avron und A. Melandri eds.)
Distribution of short-wavelength quanta between parallel light reactions

SAHA S.; OUITRAKUL R.; IZAWA S.; GOOD N.E.
1971 J. Biol. Chem. 246, 3204 - 3209
Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor

SAUER K.
1975 in: Bioenergetics of Photosynthesis (Govindjee ed.) Academic Press, S. 115 - 181
Primary events and the trapping of energy

SCHMIDT B.
1975 FEBS Lett. 58, 277 - 280
Quenching of chlorophyll a fluorescence by reduced PMS

SCHMIDT B.
1976 Biochim. Biophys. Acta (im Druck)
Interaction of oxidized and reduced N-methyl phenazonium methosulfate (PMS) with Photosystem II

SCHMIDT B.; RURAINSKI H.J.
1976 Z. Naturforsch. (im Druck)
Light-dependent interactions of phenazine Methosulfate with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-poisened chloroplasts

SELMAN B.R.; BANNISTER T.T.
1971 Biochim. Biophys. Acta 253, 428 - 436
Trypsin inhibition of Photosystem II

SELMAN B.R.; BANNISTER T.T.; DILLEY R.A.
1973 Biochim. Biophys. Acta 292, 566 - 581
Trypsin inhibition of electron transport

SLOVACEK R.E.; BANNISTER T.T.
1976 Biochim. Biophys. Acta 430, 165 - 181
Evidence against proton gradient formation being the cause of chlorophyll fluorescence quenching by N-methylphenazonium methosulfate

STERN O.; VOLMER M.
1919 Phys. Z. 20, 183 - 188
Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz

STROTMANN H.; WENNIGER R.; GÖSSELN C.
1972 FEBS Lett. 21, 289 - 292
Trypsin inhibition of cyclic photophosphorylation

SUN A.S.K.; SAUER K.
1971 Biochim. Biophys. Acta 256, 409 - 427
Pigment systems and electron transport in chloroplasts II. Emerson enhancement in broken spinach chloroplasts

THOMAS J.B.; VOSKUIL W.; OLSMAN H.; DE BOOIS H.M.
1962 Biochim. Biophys. Acta 59, 224 - 226
Fluorescence-induction phenomena in isolated chloroplasts

TREBST A.
1974 Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 423 - 458
Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts

TREBST A.; ECK H.; WAGNER S.
1963 in: Photosynthetic Mechanism in Green Plants, Natl Acad. Sci.- Natl. Res. Council, S. 174 - 194
Effect of quinones and oxygen in the electron transport system of chloroplasts

TREBST A.; HARTH E.; DRABER W.
1970 Z. Naturforsch. 25 b, 1157 - 1159
On a new inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts

TREBST A.; HAUSKA G.
1974 Naturwissenschaften 61, 308 - 316
Energiekonservierung in der photosynthetischen Membran der Chloroplasten

TREBST A.; PISTORIUS E.
1965 Z. Naturforsch. 20 b, 143 - 147
Zum Mechanismus des photosynthetischen Elektronentransportes in isolierten Chloroplasten

WARBURG O.; LÜTTGENS W.L.
1944 Naturwissenschaften 32, 161
Experimente zur Assimilation der Kohlensäure

WITT H.T.
1971 Quart. Rev. Biophys. 4, 365 - 477
Coupling of quanta, electron, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis. Results by pulse spectroscopic methods

WITT H.T.; RUMBERG B.; JUNGE W.
1968 in: Biochemie des Sauerstoffs (B.Hess und H.J. Staudinger eds.) Springer Verlag, S. 262 - 306
Electron transfer, field changes, proton translocation and phosphorylation in photosynthesis

WRAIGHT C.A.; CROFTS A.R.
1970 Eur. J. Biochem. 17, 319 - 327
Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts

YAMASHITA T.; BUTLER W.L.
1968 Plant Physiol. 43, 1978 - 1986
Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts

YAMASHITA T.; BUTLER W.L.
1969 Plant Physiol. 44, 1342 - 1346
Photooxidation by Photosystem II of Tris-washed chloroplasts

YAMASHITA T.; BUTLER W.L.
1969 a Plant Physiol. 44, 435 - 438
Inhibition of the Hill reaction by Tris and restoration by electron donation to Photosystem II

YAMASHITA T.; HORIO T.
1968 Plant Cell Physiol. 9, 268 - 684
Non-cyclic photophosphorylation by spinach grana treated with 0.8 M Tris buffer

ZAUGG W.S.
1964 J. Biol. Chem. 239, 3964 - 3970
Spectroscopic characteristics and some chemical properties of N-methylphenazinium methylsulfate (Phenazine methosulfate) and pyocyanin at the semiquinoid oxidation level

Herrn Prof Dr. G. Jacobi sei gedankt für die Überlassung des Themas und für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Trebst (Bochum) danke ich für seine Bereitschaft sich nach dem Tode von Prof. Jacobi als Hauptgutachter und Prüfer im Doktorexamen zur Verfügung zu stellen.

Für die ständige Hilfsbereitschaft sei allen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanze und am Pflanzenphysiologischen Institut gedankt. Insbesondere gilt der Dank Herrn Dr. H.J. Rurainski für viele anregende Diskussionen.

Lebenslauf

31. Juli 1947	geboren in Vohenstrauß als Sohn des Hermann Schmidt und seiner Ehefrau Margarete, geb. Riedel
1953 - 1957	Besuch der Volksschule in Vohenstrauß/ Oberpfalz
1957 - 1966	Besuch von Oberrealschulen in Weiden und Cham und von Gymnasien in Rheydt und Mönchengladbach
1966	Reifeprüfung am mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium in Mönchengladbach
1967 - 1968	Bundeswehrsoldat in Bad Reichenhall
1969	Beginn des Studiums der Fächer Biologie und Chemie an der Universität Göttingen
Juli 1972	Diplomhauptprüfung im Fach Biologie
Februar 1973	Beendigung der Diplomarbeit
Dezember 1973	Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie
seit April 1974	wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanze an der Universität Göttingen

Ich bin seit 1971 verheiratet und habe einen zweijährigen Sohn.